

明 細 書

WT1由来のHLA-DR結合性抗原ペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、WT1由来のHLA-DRB1*0405結合性抗原ペプチドに関する。

背景技術

[0002] WT1遺伝子(Wilms' tumor gene 1)は、小児の腎腫瘍であるWilms腫瘍の原因遺伝子の1つとして同定された(Cell 60: 509, 1990、Nature 343: 774, 1990)。WT1遺伝子は、細胞の増殖・分化・アポトーシスおよび臓器の形成などに関する重要な働きをする転写因子WT1をコードしている(Int. Rev. Cytol. 181: 151, 1998)。当初、WT1遺伝子は、癌抑制遺伝子と位置付けられていたが、その後の研究により白血病および肺癌や乳癌を含む種々の固形癌で発現が認められ、むしろ癌の増殖を促進する癌遺伝子としての作用を有することが示された。また、WT1由来のペプチドでHLA-A*0201陽性またはHLA-A*2402陽性の末梢血単核球をin vitroで刺激することにより、ペプチド特異的な細胞傷害性T細胞(CTL)が誘導され、これらのCTLは、内因性にWT1を発現する白血病や固形癌の癌細胞を傷害することが示された。これらの結果より、WT1は癌免疫療法(癌ワクチン療法)の有望な標的分子であることが示された(Int. J. Hematol 76: 127, 2002)。

[0003] CTLが有効に誘導されるためには、癌抗原に特異的なヘルパーT細胞の存在が重要であることが報告されている(Cancer. Res. 62:6438, 2002)。

ヘルパーT細胞(CD4陽性T細胞)は、抗原提示細胞のMHCクラスII分子と抗原ペプチドとの複合体を認識して誘導(増殖)・活性化される。活性化されたヘルパーT細胞はIL-2、IL-4、IL-5、IL-6、あるいはインターフェロンなどのサイトカインを産生し、B細胞の増殖、分化、成熟を介助する。また活性化ヘルパーT細胞は、T細胞の他のサブセット(Tc、TD細胞など)の増殖、分化、成熟を促進する機能を有する。このように活性化ヘルパーT細胞はB細胞、T細胞の増殖・活性化を促進することにより免疫系を活性化する機能を有することから、癌免疫療法(癌ワクチン療法)において、MHCクラスII結合性の抗原ペプチド(ヘルパーペプチドとも言う)の作用を受けヘル

パーT細胞の機能を増強し、癌ワクチンの効果を増強することは有用であると考えられている(J.Immunother., 24:195, 2001)。

WT1に関しては、MHCクラスII分子のサブタイプの1種であるHLA-DRB1*0401に結合する1種類の抗原ペプチドに関する報告(Cancer. Immunol. Immunother. 51:271, 2002)があるが、それ以外のサブタイプについては報告されていない。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0004] 本発明の目的は、WT1由来のHLA-DRB1*0405結合性抗原ペプチド、および当該ペプチドの癌ワクチン作用増強剤としての使用を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0005] 本発明者は、癌免疫療法において癌ワクチンの作用を増強できる、WT1由来のMHCクラスII結合性抗原ペプチド(ヘルパーペプチド)につき鋭意検討を行った。その結果、WT1には、多数存在するMHCクラスIIサブクラスのうち、HLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導する作用を持つ抗原ペプチド部分が存在していることを初めて見出した。そしてこの知見により、HLA-DRB1*0405陽性の癌患者に対し、WT1特異的ヘルパーT細胞を誘導・増強することのできる新たな治療法が可能となった。

ところで近年の報告によると、一つのヘルパーペプチドが複数のHLA-classII分子に結合し、ヘルパーCD4陽性T細胞を誘導しうること、すなわちpromiscuous helper peptideの存在が分かっている(British J. cancer, 85(10),p1527-1534(2001)、J.Immunol.,169,p557-565(2002))。そこで本発明者は、前記HLA-DRB1*0405結合性抗原ペプチド(ヘルパーペプチド)の1つとして見出したWT1₃₃₂₋₃₄₇が、promiscuous helper peptideである可能性について検討したところ、WT1₃₃₂₋₃₄₇はHLA-DRB1*0405分子だけでなく、HLA-DRB1*1502にも結合するpromiscuous helper peptideであることが示された。よって本発明のヘルパーペプチドWT1₃₃₂₋₃₄₇は、HLA-DRB1*0405を有する患者だけでなく、HLA-DRB1*1502を有する患者に対しても適用可能なヘルパーペプチドである。併せて、WT1には、多数存在するMHCクラスIIサブクラスのうち、HLA-DRB1*1502に結合してヘルパーT細胞を誘導する作用を持つ抗原ペプチド部

分が存在していることを初めて見出した。

本発明はこのような知見に基づき完成するに至ったものである。

[0006] すなわち本発明は、

- (1) 配列番号:1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列における連続する10～25アミノ酸からなるペプチドであって、HLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導するペプチド、
- (2) 配列番号:2～配列番号:23のいずれかに記載のアミノ酸配列を含有する、前記(1)記載のペプチド、
- (3) 配列番号:24に記載のアミノ酸配列を含有する、前記(2)記載のペプチド、
- (4) 配列番号:2～配列番号:23のいずれかに記載のアミノ酸配列の第1位、第4位、第6位および／または第9位のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含有する10～25アミノ酸からなるペプチドであって、HLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導するペプチド、
- (5) 配列番号:2～配列番号:23のいずれかに記載のアミノ酸配列の第1位、第4位、第6位および／または第9位のアミノ酸残基がそれぞれ以下の中から選択されるいずれかのアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含有する、前記(4)記載のペプチド:
第1位:フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、
第4位:バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、
第6位:アスパラギン、セリン、スレオニン、グルタミン、リジン、アスパラギン酸、
第9位:アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、
- (6) 配列番号:24に記載のアミノ酸配列の第3位、第6位、第8位および／または第11位のアミノ酸残基がそれぞれ以下の中から選択されるいずれかのアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含有する、前記(5)記載のペプチド:
第3位:フェニルアラニン、トリプトファン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、
第6位:バリン、イソロイシン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、
第8位:アスパラギン、セリン、スレオニン、グルタミン、リジン、アスパラギン酸、

第11位:アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、

(7) 配列番号:1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列における連続する10〜25アミノ酸からなるペプチドであって、HLA-DRB1*1502に結合してヘルパーT細胞を誘導するペプチド、

(8) 配列番号:46〜配列番号:56のいずれかに記載のアミノ酸配列を含有する、前記(7)記載のペプチド、

(9) 配列番号:24に記載のアミノ酸配列を含有する、前記(7)記載のペプチド、

(10) 前記(1)〜(9)いずれか記載のペプチドと癌抗原ペプチドとを含有するペプチド、

(11) 前記(1)〜(10)いずれか記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(12) 前記(11)記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、

(13) 前記(12)記載の発現ベクターを含有する細胞、

(14) 前記(13)記載の細胞を、ペプチドの発現可能な条件下で培養することを特徴とする、前記(1)〜(10)いずれか記載のペプチドの製造方法、

(15) 前記(1)〜(9)いずれか記載のペプチドに特異的に結合する抗体、

(16) 前記(1)〜(10)いずれか記載のペプチド、前記(12)記載の発現ベクターまたは前記(13)記載の細胞と、薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物、

(17) 癌の治療剤または予防剤である、前記(16)記載の医薬組成物、

(18) 前記(1)〜(9)のいずれか記載のペプチド、前記(1)〜(9)のいずれか記載のペプチドにかかる前記(12)記載の発現ベクター、または前記(1)〜(9)のいずれか記載のペプチドにかかる前記(13)記載の細胞と、薬学的に許容される担体とを含有する、ヘルパーT細胞誘導剤である、前記(16)記載の医薬組成物、

(19) 前記(1)〜(9)のいずれか記載のペプチド、前記(1)〜(9)のいずれか記載のペプチドにかかる前記(12)記載の発現ベクター、または前記(1)〜(9)のいずれか記載のペプチドにかかる前記(13)記載の細胞と、薬学的に許容される担体とを含有する、癌ワクチンの作用増強剤である、前記(16)記載の医薬組成物、

(20) 前記(10)記載のペプチド、前記(10)記載のペプチドにかかる前記(12)記載の発現ベクター、または前記(10)記載のペプチドにかかる前記(13)記載の細胞

と、薬学的に許容される担体とを含有する、癌の治療剤または予防剤である、前記(16)記載の医薬組成物、

(21) 前記(1)～(10)のいずれか記載のペプチド、前記(12)記載の発現ベクター、または前記(13)記載の細胞の、癌の治療または予防剤の製造における使用、

(22) 癌を治療または予防するための方法であって、前記(1)～(10)のいずれか記載のペプチド、前記(12)記載の発現ベクター、または前記(13)記載の細胞を、それを必要とする対象に投与方法、

(23) 前記(1)～(9)のいずれか記載のペプチドと癌抗原ペプチドを組み合わせるなる医薬組成物、

(24) 癌を治療または予防するための、前記(23)記載の医薬組成物、

(25) 前記(1)～(9)のいずれか記載のペプチドおよび薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物と、癌抗原ペプチドおよび薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物とを含む、癌の治療または予防のためのキット、

(26) 前記(1)～(9)のいずれか記載のペプチドと癌抗原ペプチドとの組み合わせの、癌の治療または予防剤の製造における使用、ならびに

(27) 癌を治療または予防するための方法であって、前記(1)～(9)のいずれか記載のペプチドと癌抗原ペプチドとを組み合わせ、それを必要とする対象に投与方法、に関する。

発明の効果

[0007] 本発明により、WT1由来のHLA-DRB1*0405結合性抗原ペプチド、当該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、これらペプチドやポリヌクレオチドを含むヘルパーT細胞の誘導剤などが提供される。本発明のヘルパーT細胞の誘導剤は、癌ワクチンの作用増強剤として有用である。本発明の癌ワクチンの作用増強剤は、HLA-DRB1*0405陽性の多くの癌患者に適用可能であり、特にWT1ワクチンの作用増強剤として有用である。

発明を実施するための最良の形態

[0008] 本発明は、配列番号:1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列における連続する10～25アミノ酸からなるペプチドであって、HLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘

導するペプチドを提供する。本発明のペプチドは、そのN末端アミノ酸残基および/またはC末端のアミノ酸残基が修飾されていても良く、また特定アミノ酸残基が改変されていてもよい。

以下「ヘルパーT細胞を誘導するペプチド(CD4陽性T細胞を誘導するペプチド)」のことを、「ヘルパーペプチド」と称することもある。

配列番号:1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列は、Cell, 60:509, 1990、NCBIデータベースAccession No.XP_034418およびAccession No. P19544に記載された公知の配列である。

[0009] 本発明のペプチドは、配列番号:1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列における連続する10〜25アミノ酸からなるWT1の部分ペプチドである。ここで「10〜25アミノ酸」との定義は、MHCクラスII結合性ペプチドが、一般的に10〜25アミノ酸からなることに基づく(Immunogenetics, 41,178-228(1995)、Biochimica et Biophysica Acta 1316, 85-101 (1996)、Immunology,96,1-9 (1999)、Peptides, Vol.19, 179-198 (1998)、immunobiology, 5th Edt., 116-117, Garland Publishing (2001))。好ましくは、ヒトWT1のアミノ酸配列における連続する13〜17アミノ酸からなるペプチドが挙げられる。

本発明のペプチドは、配列番号:1に記載のアミノ酸配列における連続する10〜25アミノ酸からなるペプチド(候補ペプチド)を合成し、該ペプチドがHLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導できるか否かをアッセイすることにより、同定することができる。

[0010] ここで、ペプチドの合成については、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて行うことができる。該合成方法としては、文献(ペプタイド・シンセシス(Peptide Synthesis), Interscience, New York, 1966;ザ・プロテインズ(The Proteins), Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976;ペプチド合成, 丸善(株), 1975;ペプチド合成の基礎と実験, 丸善(株), 1985;医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991)などに記載されている方法が挙げられる。

[0011] 候補ペプチドがHLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導することは、例えばCancer. Immunol. Immunother. 51:271 (2002)に記載の方法や実施例記載の方法、また以下に記載の方法などにより調べることができる。

[0012] まず、HLA-DRB1*0405陽性のヒトから末梢血単核球(PBMC)を回収し、浮遊細胞を除去することにより樹状細胞(付着細胞)を調製する。また別途、同一のHLA-DRB1*0405陽性のヒトから Ficoll-Paqueの密度勾配遠心法等によりヘルパーT細胞(CD4陽性T細胞)を調製する。

次に、前記樹状細胞に対して候補ペプチドを添加して培養した後、この樹状細胞と前記ヘルパーT細胞とを混合培養する。その後ヘルパーT細胞を回収し、これを候補ペプチドをパルスした樹状細胞で同様に何回か刺激する。ペプチド刺激に反応してヘルパーT細胞が誘導(活性化)されたことは、例えば(1)当該ヘルパーT細胞の増殖活性や、(2)ヘルパーT細胞によるサイトカイン産生活性を測定することにより、調べることができる。ここで(1)の増殖活性としては、具体的にはヘルパーT細胞内に取り込まれた $[^3\text{H}]$ -チミジン量を測定することにより調べることができる。また(2)のサイトカイン産生活性は、活性化ヘルパーT細胞が産生するIFN- γ などのサイトカインの量を酵素免疫測定法(ELISA)等により測定することによって調べることができる。

[0013] MHCクラスI分子やMHCクラスII分子に結合して提示される抗原ペプチドの配列には規則性(モチーフ)が存在している。MHCクラスI分子と結合するペプチドの両端には、MHC分子と結合するために重要なアミノ酸残基が存在するが、MHCクラスII分子に結合するペプチドの両端には、そのようなものは存在せず、この部分はMHCクラスII分子とは結合していない。しかし、ペプチドはMHCクラスII分子のペプチド収容溝に沿って細長くはまり込み、固定される。ペプチドがペプチド収容溝の中に固定されるのは、ペプチド収容溝にペプチド上のアミノ酸残基の側鎖が結合することと、すべてのMHCクラスII分子のペプチド収容溝によく保存されたアミノ酸残基の側鎖とペプチド主鎖とが結合することによる。ペプチド収容溝はMHCクラスII分子ごとに、ペプチド収容溝にある大小のポットを構成するアミノ酸残基に多型性がある。

[0014] 今までのX線結晶構造解析からは、最小のMHCクラスII結合性ペプチドの第1、4、6、9番目のアミノ酸残基の側鎖が、これらの結合ポケットにはまり込んでいることが示されている。

異なる対立遺伝子由来のMHCクラスII分子のそれぞれについて、結合するペプチドに共通するアミノ酸残基のパターンを解析することにより、MHCクラスII分子のペプ

チド収容溝のポケット部分に結合するペプチドのアミノ酸残基のモチーフを推定できる。結合モチーフをもった約9個のアミノ酸残基からなるペプチドがペプチド収容溝の中に結合し、ペプチドの両端は溝の両端からはみ出すことができるために、MHCクラスII分子に結合できるペプチドの長さには原則的に制限はないと考えられている。しかし多くの場合、長いペプチドはペプチダーゼで切られ、13〜17個のアミノ酸の長さになっていることが多い(immunobiology, 5th Edt., 116-117, Garland Publishing (2001))。

[0015] HLA-DRB1*0405に結合性を有するペプチドに関しては、9アミノ酸からなるHLA(MHC)結合部分のうちの第1、4、6、9番目のアミノ酸残基が、以下に示す規則性(モチーフ)を有することが予測されている(Immunogenetics, 41,178-228(1995)、Biochimica et Biophysica Acta 1316, 85-101 (1996)参照)。

[0016] 第1位:フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)、バリン(V)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、

第4位:バリン(V)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、

第6位:アスパラギン(N)、セリン(S)、スレオニン(T)、グルタミン(Q)、リジン(K)、アスパラギン酸(D)、

第9位:アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、グルタミン(Q)。

[0017] 近年、これらの規則性に基づき、MHCクラスII抗原に結合可能と予想されるペプチド配列を、インターネット上、MHCクラスII結合配列予測プログラムProPred(Bioinformatics 17: 1236, 2001)を使用することにより検索することができる。

[0018] 本発明は、WT1(配列番号:1)がHLA-DRB1*0405(MHCクラスIIの1種)に結合してヘルパーT細胞を誘導する抗原ペプチド部分を有していることを見出したものであるが、当該WT1のアミノ酸配列のうち、HLA-DRB1*0405に結合性を有すると予測される前記9アミノ酸部分としては、例えば配列番号:2〜23に記載のWT1の9アミノ酸部分を挙げることができる。すなわち本発明のペプチドの具体例としては、配列番号:2〜配列番号:23のいずれかに記載のアミノ酸配列を含有し、かつHLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導するペプチドが挙げられる。

- [0019] 当該ペプチドは、配列番号:2〜23のいずれか記載のアミノ酸配列を含有するWT1の部分ペプチドであり、かつHLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導する活性を有する限り、その長さは特に限定されない。前述のように、当該結合モチーフ構造を有する約9個のアミノ酸残基からなるペプチドがペプチド収容溝の中に結合し、ペプチドの両端は溝の両端からはみ出すことができるために、MHCクラスII分子に結合できるペプチドの長さには原則的に制限はない。しかしながら長いペプチドはペプチダーゼで切断されるため、現在までに報告されているMHCクラスII結合性ペプチドは10〜25アミノ酸程度の長さを有している(Immunogenetics, 41,178-228 (1995)、Biochimica et Biophysica Acta 1316, 85-101 (1996)、Immunology,96,1-9 (1999)、Peptides, Vol.19, 179-198 (1998)、immunobiology, 5th Edt., 116-117, Garland Publishing (2001))。これと同様に、本発明のペプチドは10〜25アミノ酸程度の長さであることが好ましく、13〜17アミノ酸程度の長さであることがより好ましい。
- [0020] 従って、配列番号:2〜配列番号:23のいずれか記載のアミノ酸配列を含有する本発明のペプチドの好ましい形態としては、配列番号:2〜配列番号:23のいずれかに記載のアミノ酸配列を含有する10〜25アミノ酸(好ましくは13〜17アミノ酸)からなるWT1の部分ペプチドであって、HLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導する活性を有するペプチドが挙げられる。
- [0021] より好ましい形態としては、配列番号:12に記載のアミノ酸配列を含有する10〜25アミノ酸(好ましくは13〜17アミノ酸)からなるWT1の部分ペプチドであって、HLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導する活性を有するペプチドが挙げられる。さらに好ましい形態としては、配列番号:24に記載のアミノ酸配列を含有する16〜25アミノ酸(好ましくは16〜17アミノ酸)からなるWT1の部分ペプチドであって、HLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導する活性を有するペプチドが挙げられる。なお、ここで配列番号:24に記載のアミノ酸配列は、配列番号:12に記載のアミノ酸配列を含有する16アミノ酸からなるWT1の部分ペプチドである。
- さらに好ましい形態としては、配列番号:24に記載のアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。
- [0022] 本発明のペプチドは、活性を保持する範囲内で、適宜改変されていても良い。ここ

でアミノ酸残基の「改変」とは、アミノ酸残基の置換、欠失および／または付加(ペプチドのN末端、C末端へのアミノ酸の付加も含む)を意味し、好ましくはアミノ酸残基の置換が挙げられる。アミノ酸残基の置換に係る改変の場合、置換されるアミノ酸残基の数および位置は、ヘルパーペプチドとしての活性が維持される限り、任意であるが、前記したように通常、HLAクラスII分子に結合するペプチドの長さが10〜25アミノ酸程度であることから、1個から数個の範囲が好ましい。

- [0023] 当該置換に係るアミノ酸残基の改変においては、HLA-DRB1*0405に対する結合モチーフ構造を有する9個のアミノ酸からなるペプチドのうちの、第1位、第4位、第6位および／または第9位のアミノ酸残基の置換が好ましい。

このような本発明の置換に係るペプチドの具体的な態様としては、配列番号:2〜配列番号:23のいずれかに記載のアミノ酸配列の第1位、第4位、第6位および／または第9位のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含有する10〜25アミノ酸からなるペプチドであって、HLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導するペプチドが挙げられる。

- [0024] 好ましくは、配列番号:2〜配列番号:23のいずれかに記載のアミノ酸配列の第1位、第4位、第6位および／または第9位のアミノ酸残基が、
第1位:フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、
第4位:バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、
第6位:アスパラギン、セリン、スレオニン、グルタミン、リジン、アスパラギン酸、
第9位:アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、
の中から選択されるいずれかのアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含有する10〜25アミノ酸からなるペプチドであって、HLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導するペプチドが挙げられる。

- [0025] 当該第1位、第4位、第6位および／または第9位のアミノ酸残基の置換は、例えば前記に示したWT1の部分配列からなる本発明の天然型のヘルパーペプチドにおいて、そのHLA-DRB1*0405への結合性を高める、若しくは活性を増強する目的で行うことができる。置換を施した第1位、第4位、第6位および／または第9位以外の部分は

、天然型の配列のまま(すなわちWT1の部分配列のまま)であっても良く、また活性を保持する限りさらなる改変を施しても良い。

[0026] より好ましくは、配列番号:12に記載のアミノ酸配列の第1位、第4位、第6位および／または第9位のアミノ酸残基が、
第1位:フェニルアラニン、トリプトファン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、
第4位:バリン、イソロイシン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、
第6位:アスパラギン、セリン、スレオニン、グルタミン、リジン、アスパラギン酸、
第9位:アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、
の中から選択されるいずれかのアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含有する10〜25アミノ酸からなるペプチドであって、HLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導するペプチドが挙げられる。

[0027] さらに好ましくは、配列番号:12に記載のアミノ酸配列を含有する16アミノ酸からなるWT1の部分ペプチド(配列番号:24)において、その第3位、第6位、第8位および／または第11位のアミノ酸残基が、
第3位:フェニルアラニン、トリプトファン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、
第6位:バリン、イソロイシン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、
第8位:アスパラギン、セリン、スレオニン、グルタミン、リジン、アスパラギン酸、
第11位:アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、
の中から選択されるいずれかのアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列からなるペプチドが例示される。また当該配列番号:24の置換アミノ酸配列を含有する16〜25アミノ酸からなるペプチドであっても良い。

[0028] 本発明はまた、前記本発明のヘルパーペプチド(天然型ペプチド、改変ペプチド)と癌抗原ペプチドとを含有するペプチド(いわゆる「エピトープペプチド」)を提供する。

[0029] 近年、癌抗原ペプチド(CTLエピトープとも言う)とヘルパーペプチド(ヘルパーエピトープとも言う)とを連結させたエピトープペプチドにより、効率的にCTLが誘導されることが報告されている。すなわち、ヘルパーペプチドにより活性化されたヘルパーT細胞(CD4陽性T細胞)は、CTLの分化の誘導や維持、およびマクロファージなどの

エフェクター細胞の活性化作用を発揮するため、癌抗原によるCTLの誘導をより増強すると考えられている。このようなヘルパーペプチドと癌抗原ペプチドとを連列したペプチドの具体例として、例えばJournal of Immunology 1999, 162: 3915-3925には、HBV由来HLA-A2拘束性抗原ペプチド6種類、HLA-A11拘束性抗原ペプチド3種類、およびヘルパーペプチドより構成されるエピトープペプチドをコードするDNA(ミニジーン)が、イン・ビボでそれぞれのエピトープに対するCTLを効果的に誘導したことが記載されている。また実際に、CTLエピトープ(メラノーマ抗原gp100の第280位-288位からなる癌抗原ペプチド)とヘルパーエピトープ(破傷風毒素由来Tヘルパーエピトープ)とを連結したペプチドが臨床試験に供されている(Clinical Cancer Res., 2001,7:3012-3024)。

[0030] このような本発明のヘルパーペプチドと癌抗原ペプチドとを含有するエピトープペプチドも、本発明のペプチドの具体例として例示することができる。

ここで癌抗原ペプチドとしては、従来公知の如何なる癌抗原ペプチドも用いることができるが、好ましくはWT1由来の癌抗原ペプチド(天然型ペプチド、改変ペプチド)が挙げられる。具体的にはWT1由来のHLA-A1, -A0201, -A0204, -A0205, -A0206, -A0207, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602などに拘束性の癌抗原ペプチドが挙げられる。

[0031] 当該WT1由来の癌抗原ペプチドとしては、例えば国際公開第2000/18795号パンフレットのTableII-TableXLVIに列挙されたペプチドおよびその改変ペプチドのうち癌抗原ペプチドとしての活性(HLA抗原に結合してCTLを誘導する活性)を有するペプチドが挙げられる。

[0032] より具体例には、例えば以下の癌抗原ペプチドが例示される:

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号:27)

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号:28)

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(配列番号:29)

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe(配列番号:30)

Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号:31)

Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号:32)

Abu Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号:33)

Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号:34)

Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号:35)

[0033] Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号:36)

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号:37)

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号:38)

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号:39)

Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号:40)

Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe (配列番号:41)

Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe (配列番号:42)

Arg Tyr Pro Ser Abu Gln Lys Lys Phe (配列番号:43)

Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (配列番号:44)

Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val (配列番号:45)

(ここでAbuは α -アミノ酪酸である)

[0034] このうち配列番号:27および配列番号:29に記載のペプチドはHLA-A24抗原およびHLA-A2抗原に結合性のペプチドであり、配列番号:44および配列番号:45に記載のペプチドはHLA-A2抗原に結合性のペプチドである。またそれ以外のペプチドはHLA-A24抗原に結合性のペプチドである。

好ましくは、前記配列番号:27、配列番号:28、配列番号:29、配列番号:30、配列番号:44または配列番号:45のいずれかに記載の癌抗原ペプチドが挙げられる。

[0035] 本発明のエピトープペプチドとして、より具体的には、例えば配列番号:2〜配列番号:23のいずれかに記載のアミノ酸配列を含有する10〜25アミノ酸よりなるWT1の部分ペプチドであって、HLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導するヘルパーペプチドと、前記配列番号:27〜45のいずれかに記載の癌抗原ペプチドとを含有するエピトープペプチドが挙げられる。

好ましくは、配列番号:24に記載のアミノ酸配列からなるヘルパーペプチドと、配列番号:27〜45のいずれかに記載の癌抗原ペプチドとを含有するエピトープペプチドが挙げられる。

より好ましくは、配列番号:24に記載のアミノ酸配列からなるヘルパーペプチドと、配列番号:27〜30、44、45のいずれかに記載の癌抗原ペプチドとを含有するエピトープペプチドが挙げられる。

[0036] このようなエピトープペプチドは、前述のように一般的なペプチド合成法によって製造することができる。またこれら複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列情報に基づいて、通常のDNA合成および遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。すなわち、当該ポリヌクレオチドを周知の発現ベクターに挿入し、得られた組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換して作製された形質転換体を培養し、培養物より目的の複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドを回収することにより製造することができる。これらの手法は、前述のように文献記載の方法(Molecular Cloning, T.Maniatis et al., CSH Laboratory(1983)、DNA Cloning, DM.Glover, IRL PRESS(1985))や後述の方法などに準じて行うことができる。

[0037] 当該エピトープペプチドがヘルパーペプチドとしての活性を有することは、前述の方法にて確認することができる。また前記エピトープペプチドが癌抗原ペプチドとしての活性を有することは、例えば WO 02/47474 号公報および Int J. Cancer:100,565-570 (2002)に記述のヒトモデル動物に供すること等により確認することができる。

本発明のエピトープペプチドは、当該エピトープペプチドに含まれるヘルパーペプチド部分により活性化されるヘルパーT細胞(CD4陽性T細胞)がCTLの分化の誘導や維持およびマクロファージなどのエフェクター細胞の活性化作用を発揮するため、当該エピトープペプチドに含まれる癌抗原ペプチドによるCTLの誘導をより増強し、よってより効率的な癌の治療または予防に使用できると考えられる。

[0038] 以上に示した本発明のペプチド(天然型ペプチド、改変ペプチドおよびエピトープペプチド)のN末端アミノ酸のアミノ基、またはC末端アミノ酸のカルボキシル基は、修飾されていても良い。すなわち、当該N末端のアミノ酸残基および/またはC末端のアミノ酸残基が修飾されたペプチドも、本発明のペプチドの範疇に含まれる。

[0039] ここでN末端アミノ酸のアミノ基の修飾基としては、例えば1〜3個の炭素数1から6

のアルキル基、フェニル基、シクロアルキル基、アシル基が挙げられ、アシル基の具体例としては炭素数1から6のアルカノイル基、フェニル基で置換された炭素数1から6のアルカノイル基、炭素数5から7のシクロアルキル基で置換されたカルボニル基、炭素数1から6のアルキルスルホニル基、フェニルスルホニル基、炭素数2から6のアルコキシカルボニル基、フェニル基で置換されたアルコキシカルボニル基、炭素数5から7のシクロアルコキシで置換されたカルボニル基、フェノキシカルボニル基等が挙げられる。

[0040] C末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾したペプチドとしては、例えばエステル体およびアミド体が挙げられ、エステル体の具体例としては、炭素数1から6のアルキルエステル、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキルエステル、炭素数5から7のシクロアルキルエステル等が挙げられ、アミド体の具体例としては、アミド、炭素数1から6のアルキル基の1つまたは2つで置換されたアミド、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキル基の1つまたは2つで置換されたアミド、アミド基の窒素原子を含んで5から7員環のアザシクロアルカンを形成するアミド等が挙げられる。

[0041] 本発明はまた、前記本発明のペプチド(天然型ペプチド、改変ペプチドまたはエピトープペプチド)をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドは、DNAの形態であってもRNAの形態であっても良い。これら本発明のポリヌクレオチドは、本発明のペプチドのアミノ酸配列情報およびそれによりコードされるDNAの配列情報に基づき容易に製造することができる。具体的には、通常のDNA合成やPCRによる増幅などによって、製造することができる。

[0042] 具体的には、例えば前記エピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドが挙げられる。より具体的には、例えば配列番号:2ー配列番号:23のいずれかに記載のアミノ酸配列を含有する10ー25アミノ酸よりなるWT1の部分ペプチドであって、HLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導するヘルパーペプチドと、前記配列番号:27ー45のいずれかに記載の癌抗原ペプチドとを含有するエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

好ましくは、配列番号:24に記載のアミノ酸配列からなるヘルパーペプチドと、配列番号:27ー45のいずれかに記載の癌抗原ペプチドとを含有するエピトープペプチド

をコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

より好ましくは、配列番号:24に記載のアミノ酸配列からなるヘルパーペプチドと、配列番号:27-30、44、45のいずれかに記載の癌抗原ペプチドとを含有するエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドには、当該ポリヌクレオチドの相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって本発明のペプチドと同等の活性を有するペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれる。ここに、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」に関して、ここで使用されるハイブリダイゼーションは、例えば、Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T. 著、モレキュラークローニング第2版 (Molecular Cloning 2nd edition)、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行 (Cold Spring Harbor Laboratory press) 等に記載される通常の方法に準じて行うことができる。また「ストリンジェントな条件下」とは、例えば、 $6\times\text{SSC}$ (1.5M NaCl , 0.15M クエン酸三ナトリウムを含む溶液を $10\times\text{SSC}$ とする)、 50% ホルムアミドを含む溶液中で 45°C にてハイブリッドを形成させた後、 $2\times\text{SSC}$ で 50°C にて洗浄するような条件 (Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6) 等を挙げることができる。

[0043] 前記で作製された本発明のポリヌクレオチドを発現ベクターに組み込むことにより、本発明のペプチドを発現するための組換え発現ベクターを作製することができる。

ここで用いる発現ベクターとしては、用いる宿主や目的等に応じて適宜選択することができ、プラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター等が挙げられる。

[0044] 例えば、宿主が大腸菌の場合、ベクターとしては、pUC118、pUC119、pBR322、pCR3等のプラスミドベクター、 λ ZAPII、 λ gt11などのファージベクターが挙げられる。宿主が酵母の場合、ベクターとしては、pYES2、pYEUra3などが挙げられる。宿主が昆虫細胞の場合には、pAcSGHisNT-Aなどが挙げられる。宿主が動物細胞の場合には、pKCR、pCDM8、pGL2、pcDNA3.1、pRc/RSV、pRc/CMVなどのプラスミドベクターや、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクターなどのウイルスベクターが挙げられる。

[0045] 前記ベクターは、発現誘導可能なプロモーター、シグナル配列をコードする遺伝子

、選択用マーカー遺伝子、ターミネーターなどの因子を適宜有していても良い。

また、単離精製が容易になるように、チオレドキシン、Hisタグ、あるいはGST(グルタチオンS-トランスフェラーゼ)等との融合タンパク質として発現する配列が付加されていても良い。この場合、宿主細胞内で機能する適切なプロモーター(lac、tac、trc、trp、CMV、SV40初期プロモーターなど)を有するGST融合タンパクベクター(pGEX4Tなど)や、Myc、Hisなどのタグ配列を有するベクター(pcDNA3.1/Myc-Hisなど)、さらにはチオレドキシンおよびHisタグとの融合タンパク質を発現するベクター(pET32a)などを用いることができる。

[0046] 前記で作製された発現ベクターで宿主を形質転換することにより、当該発現ベクターを含有する形質転換細胞を作製することができる。

ここで用いられる宿主としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。大腸菌としては、E.coli K-12系統のHB101株、C600株、JM109株、DH5 α 株、AD494(DE3)株などが挙げられる。また酵母としては、サッカロミセス・セルビジエなどが挙げられる。動物細胞としては、L929細胞、BALB/c3T3細胞、C127細胞、CHO細胞、COS細胞、Vero細胞、Hela細胞などが挙げられる。昆虫細胞としてはsf9などが挙げられる。

[0047] 宿主細胞への発現ベクターの導入方法としては、前記宿主細胞に適合した通常の導入方法を用いれば良い。具体的にはリン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、遺伝子導入用リピッド(Lipofectamine、Lipofectin; Gibco-BRL社)を用いる方法などが挙げられる。導入後、選択マーカーを含む通常の培地にて培養することにより、前記発現ベクターが宿主細胞中に導入された形質転換細胞を選択することができる。

[0048] 以上のようにして得られた形質転換細胞を好適な条件下で培養し続けることにより、本発明のペプチドを製造することができる。得られたペプチドは、一般的な生化学的精製手段により、さらに単離・精製することができる。ここで精製手段としては、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等が挙げられる。また本発明のポリペプチドを、前述のチオレドキシンやHisタグ、GST等との融合タンパク質として発現させた場合は、こ

れら融合タンパク質やタグの性質を利用した精製法により単離・精製することができる。

[0049] 本発明は、本発明のペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。本発明の抗体は、その形態に特に制限はなく、本発明のペプチドを免疫原とするポリクローナル抗体であっても、またモノクローナル抗体であっても良い。

本発明の抗体は前記のように本発明のペプチドに特異的に結合するものであれば特に制限されないが、具体的には、配列番号:2ー配列番号:23のいずれかに記載のアミノ酸配列を含有する10ー25アミノ酸よりなるWT1の部分ペプチドであって、HLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導するヘルパーペプチドに特異的に結合する抗体を挙げることができる。好ましくは、配列番号:24に記載のアミノ酸配列からなるヘルパーペプチドに特異的に結合する抗体を挙げることができる。

[0050] これらの抗体の製造方法は、すでに周知であり、本発明の抗体もこれらの常法に従って製造することができる(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.12ー11.13、Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H, D.ら編, Cold Spring Harbor Laboratory Press 出版 New York 1989)。

[0051] 具体的には、本発明のペプチドを免疫原として用い、家兎等の非ヒト動物を免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、本発明のペプチドをマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞の中から得ることができる(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4ー11.11)。

[0052] 本発明のペプチドに対する抗体の作製は、宿主に応じて種々のアジュバントを用いて免疫学的反応を高めることによって行うこともできる。そのようなアジュバントには、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、並びにリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニンおよびジニトロフェノールのような表面活性物質、BCG(カルメットーゲラン桿菌)やコリネバクテリウム・パルヴムなどのヒトアジュバントなどがある。

[0053] 以上のように本発明のペプチドを用いて常法により適宜動物を免疫することにより、ペプチドを認識する抗体、さらにはその活性を中和する抗体が容易に作製できる。抗体の用途としては、アフィニティークロマトグラフィー、免疫学的診断等が挙げられる。免疫学的診断は、イムノブロット法、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(ELISA)、蛍光あるいは発光測定法等より適宜選択できる。このような免疫学的診断は、WT1遺伝子が発現している癌、すなわち胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の診断において有効である。

[0054] 本発明は、本発明のペプチド(天然型ペプチド、改変ペプチド、エピトープペプチド)、本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、または本発明の発現ベクターを含有する細胞と、薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物を提供する。当該医薬組成物は、ヘルパーT細胞の誘導剤、癌ワクチンの作用増強剤として有効に使用できる。以下具体的に説明する。

[0055] (1) 本発明のペプチドを有効成分とするヘルパーT細胞の誘導剤(癌ワクチンの作用増強剤)

本発明のペプチドは、ヘルパーT細胞の誘導能を有するものであり、誘導されたヘルパーT細胞は、CTLの分化の誘導や維持、およびマクロファージなどのエフェクター細胞の活性化作用を介して癌ワクチンの作用であるCTL誘導活性をさらに増強することができる。すなわち本発明は、本発明のペプチドを有効成分として含有する癌ワクチンの作用増強剤(癌ワクチンの作用増強剤としての医薬組成物)を提供する。本発明の作用増強剤をHLA-DRB1*0405陽性かつWT1陽性の患者に投与すると、抗原提示細胞のHLA-DRB1*0405抗原に本発明のペプチドが提示され、ペプチドとHLA-DRB1*0405抗原との複合体を認識する特異的ヘルパーT細胞(CD4陽性T細胞)が誘導・活性化されてCTLの分化の誘導や維持、およびマクロファージなどのエフェクター細胞の活性化作用を発揮することができ、従って、癌ワクチンの作用であるCTLの誘導・活性化を増強することができる。

[0056] 本発明の癌ワクチン作用増強剤は、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌

や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の予防または治療において使用することができる。

[0057] 本発明の癌ワクチンの作用増強剤は、癌ワクチンと同時に投与することもできれば、癌ワクチン投与前または癌ワクチン投与後に投与することも可能である。

[0058] 本発明のペプチドを有効成分とする癌ワクチン作用増強剤は、単一のヘルパーペプチドを有効成分とするものであっても、また癌抗原ペプチド(CTLエピトープ)と連結したエピトープペプチドを有効成分とするものであっても良い。前述したように近年、癌抗原ペプチド(CTLエピトープ)とヘルパーペプチド(ヘルパーエピトープ)とを連結させたエピトープペプチドにより、効率的にCTLが誘導されることが示されている。このようなエピトープペプチドの形態で投与した場合、抗原提示細胞内に取り込まれ、その後、細胞内分解を受けて生じた個々の抗原ペプチドのうち、ヘルパーペプチドはMHCクラスII抗原(HLA-DRB1*0405)と、また癌抗原ペプチドはMHCクラスI抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示される。HLA-DRB1*0405抗原とヘルパーペプチドとの複合体をヘルパーT細胞が認識し、CTLの分化の誘導や維持、およびマクロファージなどのエフェクター細胞の活性化作用を介して癌ワクチンの作用であるCTL誘導活性をさらに増強する。一方、癌抗原ペプチドとMHCクラスI抗原との複合体をCTLが認識して増殖し、癌細胞を破壊する。従って、本発明のエピトープペプチドを有効成分とする医薬組成物は、癌ワクチンの作用増強剤として使用されると共に、癌ワクチンそのものとして使用される。

[0059] 本発明のペプチドを有効成分とする癌ワクチンの作用増強剤は、細胞性免疫が効果的に成立するように、医薬として許容されるキャリアー、例えば適当なアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投与することができる。アジュバントとしては、文献(Clin. Microbiol.Rev., 7:277-289, 1994)に記載のものなどが応用可能であり、具体的には、菌体由来成分、サイトカイン、植物由来成分、海洋生物由来成分、水酸化アルミニウムの如き鉱物ゲル、リソレシチン、プルロニックポリオールの如き界面活性剤、ポリアニオン、ペプチド、または油乳濁液(エマルジョン製剤)などを挙げることができる。また、リポソーム製剤、直径数 μm のビーズに結合させた粒子状の製剤

、リピッドを結合させた製剤なども考えられる。

[0060] 投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与などが挙げられる。製剤中の本発明のペプチドの投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg〜1000mg、好ましくは0.001mg〜1000mg、より好ましくは0.1mg〜10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

[0061] 本発明はまた、本発明のペプチドと癌抗原ペプチドとを組み合わせるなる医薬組成物を提供する。本発明の組み合わせにより、癌抗原ペプチドが有する癌ワクチンとしての作用(CTLの誘導・活性化作用)が本発明のペプチドにより増強され、癌の治療または予防をより効果的に達成することができる。

「組み合わせ」とは、本発明のペプチドおよび癌抗原ペプチドの両者を混合した形態で投与すること、および別々の形態で投与することを包含する。

混合した形態で投与する場合、予め混合して製剤化されたものを使用することもできれば、別々に製剤化されたものを要時に混合して使用することもできる。

一方、別々の形態で投与する場合は、別々に製剤化されたものを、時間差をおいて別々に投与することもできれば、同時に投与することもできる。時間差をおいて投与する場合、本発明のペプチド(癌ワクチンの作用増強剤)を投与した後に癌抗原ペプチド(癌ワクチン)を投与しても良く、また癌抗原ペプチド(癌ワクチン)を投与した後に本発明のペプチド(癌ワクチンの作用増強剤)を投与しても良い。

本発明にかかる本発明ペプチドと癌抗原ペプチドとの組み合わせの一態様として、キットを例示することができる。

本発明のペプチドと組み合わせる癌抗原ペプチドとしては、従来公知の如何なる癌抗原ペプチドも用いることができるが、好ましくはWT1由来の癌抗原ペプチド(天然型ペプチド、改変ペプチド)が挙げられる。具体的には、配列番号:27〜45に記載の癌抗原ペプチドが挙げられ、好ましくは配列番号:27〜30、44、45のいずれかに記載の癌抗原ペプチドが挙げられる。

[0062] (2) 本発明の発現ベクターを有効成分とするヘルパーT細胞の誘導剤(癌ワクチンの作用増強剤)

前記本発明のペプチドのみならず、当該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターもまた、ヘルパーT細胞誘導活性を有し、癌ワクチンの作用増強剤の有効成分とすることができる。すなわち本発明は、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを有効成分として含有する癌ワクチンの作用増強剤(癌ワクチンの作用増強剤としての医薬組成物)を提供する。

[0063] 近年、癌抗原ペプチド(CTLエピトープ)とヘルパーペプチド(ヘルパーエピトープ)とを連結させたエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドが、in vivoで効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1999, 162: 3915-3925には、HBV由来HLA-A2拘束性抗原ペプチド6種類、HLA-A11拘束性抗原ペプチド3種類、およびヘルパーエピトープを連結したエピトープペプチドをコードするDNA(ミニジーン)が、イン・ビボでそれぞれのエピトープに対するCTLを効果的に誘導したことが記載されている。

[0064] 従って、前記本発明のエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドを、適当な発現ベクターに組み込むことにより、癌ワクチン作用増強剤の有効成分とすることができる。

[0065] 本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを癌ワクチン作用増強剤の有効成分として適用する際には、以下の方法が使用され得る。

本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを細胞内に導入する方法として、ウイルスベクターによる方法およびその他の方法(日経サイエンス, 1994年4月号, 20-45頁、月刊薬事, 36(1), 23-48(1994)、実験医学増刊, 12(15), (1994)、およびこれらの引用文献等)のいずれの方法も適用することができる。

[0066] ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに本発明のDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の方法としては、発現ベクターを直接筋肉内に投与する方法(DNAワクチン法)、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法

、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

[0067] 本発明の発現ベクターを実際に医薬として作用させるには、当該発現ベクターを直接体内に導入する *in vivo* 法、およびヒトからある種の細胞を採集し体外で発現ベクターを該細胞に導入しその細胞を体内に戻す *ex vivo* 法がある(日経サイエンス, 1994年4月号, 20-45頁、月刊薬事, 36(1), 23-48(1994)、実験医学増刊, 12(15), (1994)、およびこれらの引用文献等)。 *in vivo* 法がより好ましい。

[0068] *in vivo* 法により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。 *in vivo* 法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には有効成分である本発明の発現ベクターを含有する注射剤等とされ、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。また、本発明の発現ベクターを含有するリポソームまたは膜融合リポソーム(センダイウイルス(HVJ)-リポソーム等)においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができる。

製剤中の本発明の発現ベクターの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常、0.0001mg〜100mg、好ましくは0.001mg〜10mgの本発明の発現ベクターを、数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

[0069] 以上のような本発明の発現ベクターをHLA-DRB1*0405陽性かつWT1陽性の患者に投与すると、抗原提示細胞のHLA-DRB1*0405抗原に本発明のペプチドが提示され、ペプチドとHLA-DRB1*0405抗原との複合体を認識する特異的ヘルパーT細胞(CD4陽性T細胞)が誘導・活性化されてCTLの分化の誘導や維持、およびマクロファージなどのエフェクター細胞の活性化作用を発揮することができ、従って、癌ワクチンの作用であるCTL誘導活性を増強することができる。本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを有効成分とする癌ワクチン作用増強剤は、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の予防または治療のために使用することができる。

[0070] 前記においてエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを投与した場合、抗原提示細胞内に取り込まれ、その後、細胞内分解を受けて生じた個々の抗原ペプチドのうち、ヘルパーペプチドはMHCクラスII抗原(HLA-DRB1*0405)と、また癌抗原ペプチドはMHCクラスI抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示される。HLA-DRB1*0405抗原とヘルパーペプチドとの複合体をヘルパーT細胞が認識し、CTLの分化の誘導や維持、およびマクロファージなどのエフェクター細胞の活性化作用を介して癌ワクチンの作用であるCTL誘導活性をさらに増強する。一方、癌抗原ペプチドとMHCクラスI抗原との複合体をCTLが認識して増殖し、癌細胞を破壊する。従って、本発明のエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを有効成分とする医薬組成物は、癌ワクチンの作用増強剤として使用されると共に、癌ワクチンそのものとして使用される。

[0071] さらに本発明は、配列番号:1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列における連続する10〜25アミノ酸からなるペプチドであって、HLA-DRB1*1502に結合してヘルパーT細胞を誘導するペプチドを提供する。本発明のHLA-DRB1*1502結合性抗原ペプチドは、そのN末端アミノ酸残基および/またはC末端アミノ酸残基が修飾されていても良く、また特定アミノ酸残基が改変されていても良い。

本発明のHLA-DRB1*1502結合性抗原ペプチドの合成および活性測定は、前記本発明のHLA-DRB1*0405結合性抗原ペプチドと同様の手法により行うことができる。

本発明のHLA-DRB1*1502結合性抗原ペプチドは、配列番号:1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列における連続する10〜25アミノ酸からなるWT1の部分ペプチドである。好ましくは、ヒトWT1のアミノ酸配列における連続する13〜17アミノ酸からなるペプチドが挙げられる。

本発明は、ヒトWT1がHLA-DRB1*1502に結合してヘルパーT細胞を誘導する抗原ペプチド部分を有していることを見出したものであるが、MHCクラスII結合配列予測プログラムProPred(Bioinformatics 17:1236,2001)を用いた検索により、HLA-DRB1*1502に結合性を有すると予測される9アミノ酸部分(MHCクラスII分子のペプチド収容溝の中に結合し得る9アミノ酸部分)としては、例えば配列番号:46〜配列番号:56に記載

のWT1の9アミノ酸部分を挙げることができる。すなわち本発明のHLA-DRB1*1502結合性抗原ペプチドの具体例としては、配列番号:46ー配列番号:56のいずれかに記載のアミノ酸配列を含有し、かつHLA-DRB1*1502に結合してヘルパーT細胞を誘導するペプチドが挙げられる。

当該ペプチドは、10ー25アミノ酸程度の長さであることが好ましく、13ー17アミノ酸程度の長さであることがより好ましい。より好ましい形態としては、配列番号:50に記載のアミノ酸配列を含有する10ー25アミノ酸(好ましくは13ー17アミノ酸)からなるWT1の部分ペプチドであって、HLA-DRB1*1502に結合してヘルパーT細胞を誘導する活性を有するペプチドが挙げられる。さらに好ましい形態としては、配列番号:24に記載のアミノ酸配列を含有する16ー25アミノ酸(好ましくは16ー17アミノ酸)からなるWT1の部分ペプチドであって、HLA-DRB1*1502に結合してヘルパーT細胞を誘導する活性を有するペプチドが挙げられる。なお、ここで配列番号:24に記載のアミノ酸配列は、配列番号:50に記載のアミノ酸配列を含有する16アミノ酸からなるWT1の部分ペプチドである。

さらに好ましい形態としては、配列番号:24に記載のアミノ酸配列からなるWT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチドが挙げられる。

当該WT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチドは、前記したように、HLA-DRB1*0405分子だけでなく、HLA-DRB1*1502にも結合するpromiscuous helper peptideである。よってWT1₃₃₂₋₃₄₇は、HLA-DRB1*0405を有する患者だけでなく、HLA-DRB1*1502を有する患者に対しても適用可能なヘルパーペプチドであり、患者の適用範囲が広いという観点から有用である。

本発明のHLA-DRB1*1502結合性抗原ペプチドに関するエピトープペプチド、ポリヌクレオチド、抗体、および医薬組成物については、前記本発明のHLA-DRB1*0405結合性抗原ペプチドの場合と同様にして実施することができる。

[0072] 以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

実施例

[0073] 実施例1

1. 樹状細胞の調製

HLA-DRB1*0405陽性の健常人ボランティアから採取した血液からFicoll-Paqueの密度勾配遠心法により末梢血単核球(PBMC)を回収した。得られた 8×10^6 個のPBMCを1%のAB血清を含むX-VIVO 15TM培養液(Camblex社)2mlに懸濁し、6穴培養プレートに播種して2時間培養した。培養後、浮遊細胞を除去し、Hanks液で付着細胞を洗った。付着細胞は、1%のAB血清、1000U/mlのIL-4および1000U/mlのGM-CSFを含むX-VIVO 15TM培養液を用いて培養した。2日目と4日目に培養液の半量を除き、新しい培養液を加えた。6日目に100U/mlとなるようにTNF- α を添加した。7日目の細胞を樹状細胞として実験に使用した。

[0074] 2. CD4陽性T細胞(ヘルパーT細胞)の調製

上記(1)と同一の健常人ボランティアから採取した血液を用いた。RPMI培養液で2倍に希釈した血液約100mlにCD4陽性T細胞分離用抗体カクテルのロゼットセット(Stemcell社)を添加して室温で20分間放置した。その後、Ficoll-Paqueの密度勾配遠心法によりCD4陽性T細胞を回収した。

[0075] 3. WT1ペプチドに特異的なCD4陽性T細胞の誘導

WT1蛋白質のアミノ酸配列(NCBIデータベース Accession No. P19544、XP_034418、配列番号:1)よりHLA-DRB1*0405に結合する可能性のあるペプチドを予測プログラムProPred(Bioinformatics 17: 1236, 2001)を用いて3種類選んで、合成した。それらの配列は、WT1アミノ酸配列の第172位から186位のPNHSFKHEDPMGQQG(WT1₁₇₂₋₁₈₆、配列番号:25)、第225位から243位のNLYQMTSQLECMTNQMNL(WT1₂₂₅₋₂₄₃、配列番号:26)、第332位から第347位のKRYFKLSHLQMHSRKH(WT1₃₃₂₋₃₄₇、配列番号:24)であった。

[0076] 上記(1)で調製した樹状細胞を24穴培養プレートに1穴当たり 3×10^5 個播種し、配列番号:24のペプチドを50 μ g/mlになるように添加して4時間培養した後、25GyのX線を照射して細胞の増殖を止めた。次に(2)で調製したCD4陽性細胞を1穴当たり 3×10^6 個添加して樹状細胞と混合培養した。培養液は、1%のAB血清を含むX-VIVO 15TM培養液を用いた。培養開始から2日おきに培養液を半量交換するとともに20U/mlになるようにIL-2を添加した。培養開始から7日目、14日目にT細胞を回収し、

24穴プレートに1穴当たり 3×10^6 個に調整して播種し、 $20 \mu\text{g/ml}$ のペプチド(配列番号:24)でパルスした後25GyでX線照射した樹状細胞を 3×10^5 個添加して混合培養を行った。培養液は1%のAB血清、20U/mlのIL-2を含むX-VIVO 15TM培養液を用いた。

[0077] 3回目の刺激をした後のT細胞を回収し、96穴培養プレートに1穴当たり 3×10^4 個播種した。さらに $20 \mu\text{g/ml}$ のペプチド(配列番号:24)でパルスした後25GyでX線照射した樹状細胞を 3×10^4 個加えて混合培養した。陰性対照としてペプチドをパルスしていない樹状細胞をT細胞と混合培養した群、陽性対照として樹状細胞の代わりに0.2%のPHAを添加した群を設定した。80時間培養後、1穴当たり37kBqの ^3H -チミジンを添加して更に16時間培養を行った後、細胞に取り込まれた ^3H -チミジンを β -シンチレーションカウンターにて測定した。結果を図1に示した。WT1の第332位から347位のペプチド(WT1₃₃₂₋₃₄₇、配列番号:24)で刺激したCD4陽性T細胞は、WT1₃₃₂₋₃₄₇をパルスした樹状細胞と混合培養することにより増殖反応を示した。また、このCD4陽性T細胞は、ペプチドをパルスしていない樹状細胞、配列の異なる配列番号25や配列番号26のペプチドをパルスした樹状細胞との混合培養では増殖反応が認められなかった。これらの結果より、配列番号24のペプチドWT1₃₃₂₋₃₄₇は、抗原ペプチドとして特異的CD4陽性T細胞を誘導していることが明らかになった。

[0078] 実施例2

WT1ペプチドに特異的なCD4陽性T細胞株の樹立

実施例1に記載の方法で調製した樹状細胞を96穴プレートに1穴当たり 10^4 個ずつ播種し、さらに配列番号24のペプチドWT1₃₃₂₋₃₄₇で誘導したCD4陽性T細胞を96穴プレートに1穴当たり、 10^3 個ずつ播種した。培養液は、1%のAB血清、20U/mlのIL-2、 $5 \mu\text{g/ml}$ のPHAを含むX-VIVO 15TM培養液を用いた。培養を続けることにより、CD4陽性T細胞株を樹立し、「G2細胞株」と命名した。ペプチドをパルスした樹状細胞に対するG2細胞株の反応性を実施例1と同様の方法で測定した。結果を図2に示す。G2細胞株は、WT1₃₃₂₋₃₄₇のペプチドをパルスした樹状細胞と混合培養することにより増殖反応を示したが、ペプチドをパルスしていない樹状細胞との混合培養では増殖反応が認められなかった。

これらの結果より、G2細胞株は、WT1₃₃₂₋₃₄₇のペプチドに特異的なCD4陽性T細胞株であることが明らかとなった。

[0079] 実施例3

WT1ペプチドのHLA-DR分子への抗原提示

実施例1と同様の方法で、HLA-DRB1*0405陽性の健常人ボランティアから採取した血液からFicoll-Paqueの密度勾配遠心法により末梢血単核球(PBMC)を回収した。PBMCを24穴プレートに1穴当たり 10^7 個播種した。培養液は、10%のFCS、 $55 \mu\text{M}$ の2MEを含むRPMI1640培養液を用いた。エプスタイン-バーウイルス(Epstein-Barr virus: EBV)を含む培養液を添加して、4週間培養し、EBVでトランスフォームされたB細胞株を樹立し、B-LCL(-)細胞と命名した。EBVは、EBVを産生する細胞株B95-8(JCRB細胞バンクNo. 9123)の培養上清より調製した。B-LCL(-)細胞を 3×10^7 個/mLに調整し、WT1遺伝子を発現するウイルスを含む培養液を添加後、更にポリプレンを最終濃度が $8 \mu\text{g/mL}$ になるように添加して、24穴プレートに1mLずつ播種した。16時間培養した後に新しい培養液を1mLずつ添加して培養を継続した。G418(ネオマイシン)を $0.7 \mu\text{g/mL}$ で添加し、5-7日間培養し、遺伝子が導入された細胞を選択した。このようにして選択されたWT1を発現するB細胞株をB-LCL(+)細胞と命名した。B-LCL(-)細胞とB-LCL(+)細胞のWT1遺伝子の発現量をRT-PCR法で測定した。方法は、文献(Blood, 89:1405, 1997)に従い、陽性コントロールのK562細胞の発現量を1として換算した。その結果、B-LCL(-)細胞は、 1.6×10^{-4} であるのに対して、B-LCL(+)細胞は3.2であり、WT1遺伝子が高発現しているのが確認された。B-LCL(+)細胞に対するG2細胞の反応性を実施例2と同様の方法で検討した。HLA-DR拘束性を確認するためにG2細胞と混合する前にB-LCL(+)を抗HLA-DR抗体で処理した群も設定した。結果を図3に示す。ペプチド特異的CD4陽性T細胞株G2は内因的にWT1遺伝子を発現しているB-LCL(+)細胞との混合培養で増殖反応を示すこと、また、この反応は抗HLA-DR抗体により阻害されることが示された。これらの結果より、WT1₃₃₂₋₃₄₇のペプチドが細胞内でWT1蛋白質から生じ、内因性にHLA-DR分子に抗原提示されていることが示された。

[0080] 実施例4

WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチド特異的なCD4陽性T細胞株E04.1の樹立

実施例1と同様の方法で、HLA-DRB1*0405陽性の健常人ボランティアから採取した血液を用いて、樹状細胞を調製した。ただし、6日目に添加するTNF- α は、終濃度200 IU/mlとなるようにした。CD4陽性T細胞の調製は、樹状細胞の調製に用いた同一の健常人ボランティアから採取した血液を用いた。CD4陽性T細胞分離用RosetteSep (StemCell社)の添付文書に従ってCD4陽性T細胞を分離した。

上記の樹状細胞とCD4陽性T細胞を用いて、実施例1と同様の方法でWT1ペプチド(配列番号24:WT1₃₃₂₋₃₄₇)に特異的なCD4陽性T細胞を誘導した。このWT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチド特異的なCD4陽性T細胞を限界希釈法により培養を継続して、CD4陽性T細胞株E04.1を樹立した。なお、限界希釈法には、フィーダー細胞として実施例1に記載の方法で調製したPBMCをX線照射後に1穴当たり 1×10^5 個ずつ播種した。培養液は、20 IU/mlのIL-2および5 μ g/mlのPHAを含むX-VIVO 15TM培地を用いた。

WT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチドをパルスした樹状細胞に対するE04.1細胞株の増殖反応を、実施例1と同様の方法(但し³H-チミジン添加後18時間培養)で測定した。結果を図4に示す。E04.1細胞は、WT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチドをパルスした樹状細胞と混合培養することにより増殖応答を示すが、ペプチドをパルスしない樹状細胞との混合培養では増殖応答が認められないことが示された。以上より、E04.1細胞はWT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチド特異的なCD4陽性T細胞株であることが明らかとなった。

[0081] 実施例5

WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドのHLA-DRへの特異的結合

実施例4で樹立したE04.1細胞を96穴培養プレートの1穴あたりに 1×10^4 個ずつ播種した。実施例3においてHLA-DRB1*0405陽性の健常人ボランティア血液から樹立したB細胞株B-LCL (-)細胞にWT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチドを20 μ g/ml濃度でパルスした後にX線照射し、96穴培養プレートの1穴あたりに 3×10^4 個加えてE04.1細胞と混合培養した。陰性コントロールとして、ペプチドパルスをしないB-LCL (-)細胞をE04.1細胞と混合培養した群も設定した。

HLA-DR拘束性を確認するため、WT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチドをパルス後にX線照射したB-LCL (-)細胞を20 μ g/mlの抗HLA-DR抗体(G46.6, BD ParMingen社)、抗

HLA-classI抗体(G46-2.6, BD ParMingen社)、抗HLA-DQ抗体(SPVL3, Immunotech社)で30分間処理した後にE04.1細胞と混合培養する群も設定した。また、抗体処理の陰性コントロールとして、抗mouse IgG抗体で同様に処理した後にE04.1細胞と混合培養した群も設定した。

混合培養後、実施例4と同様の方法でE04.1細胞の増殖を測定した。結果を図5に示す。E04.1細胞は、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドをパルスしたB-LCL (-)細胞と混合培養することにより増殖反応を示した。しかし、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドをパルスしたB-LCL (-)細胞を抗HLA-DR抗体で処理した場合、増殖が抑制されることが示された。さらに、E04.1細胞は他の抗体で処理したWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドパルスB-LCL (-)細胞では増殖応答を示すこと、ペプチドパルスしていないB-LCL (-)細胞では増殖応答が認められないことも示された。以上より、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドはHLA分子のなかでもHLA-DRに特異的に結合して、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチド特異的CD4陽性細胞株E04.1の増殖を誘導することが示された。

[0082] 実施例6

WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドのHLA-DRB1*0405への特異的結合

HLA-DRB1*0405陽性または陰性の健常人ボランティア血液から、実施例4と同様の方法でPBMCを調製した。このPBMCを 20 μ g/mlのWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドでパルスした後にX線照射し、96穴培養プレート1穴あたりに 3×10^4 個播種した。さらに、E04.1細胞を96穴培養プレートに1穴あたりに 1×10^4 個播種して混合培養した。また、陰性コントロールとして、ペプチドをパルスしていないPBMCとE04.1細胞を混合培養した群も設定した。

混合培養後、実施例4と同様の方法でE04.1細胞の増殖を測定した。結果を図6に示す。Donor 1 (HLA-DRB1*0405/0803)およびDonor 2 (HLA-DRB1*0405/0101)はHLA-DRB1*0405陽性であり、E04.1細胞はWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドをパルスした両者由来のPBMCとの混合培養により増殖応答を示した。一方、Donor3 (HLA-DRB1*0101/1001) およびDonor 4 (HLA-DRB1*1201/0802)はHLA-DRB1*0405陰性であり、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドをパルスした両者由来のPBMCとの混合培養においても増殖応答は認められなかった。また、ペプチドパルスしていないPBMCでは全て増殖応答が

認められなかった。以上より、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドは多型を示すHLA-DRB1分子の中でも、HLA-DRB1*0405に特異的に結合して、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチド特異的CD4陽性細胞株E04.1の増殖を誘導することが示された。

[0083] 実施例7

WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドのHLA-DRB1*0405への抗原提示

実施例3においてHLA-DRB1*0405陽性の健常人ボランティア血液から樹立したB細胞株B-LCL (-)とWT1発現B細胞株B-LCL (+)をX線照射後に、96穴培養プレート₃₃₂₋₃₄₇の1穴あたりに 3×10^4 個、E04.1細胞を 1×10^4 個播種して混合培養した。その後、実施例4と同様の方法でE04.1細胞の増殖を測定した。結果を図7に示す。E04.1細胞はWT1発現B細胞株B-LCL (+)との混合培養により増殖応答を示し、WT1を発現しないB-LCL (-)との混合培養では増殖応答が認められなかった。

次に、アポトーシスを誘導したB-LCL (-)またはB-LCL (+)細胞 1×10^5 個を、実施例4と同様の方法でHLA-DRB1*0405陽性の健常人ボランティア血液から誘導した樹状細胞 3×10^4 個と16時間培養後、96穴培養プレートの1穴に播種して、 1×10^4 個のE04.1細胞と混合培養した。その後、実施例1と同様の方法でE04.1細胞の増殖を測定した。結果を図8に示す。E04.1細胞はアポトーシスしたB-LCL (+)をパルスした樹状細胞との混合培養により増殖応答を示し、アポトーシスしたB-LCL (-)をパルスした樹状細胞との混合培養では増殖応答は認められなかった。以上より、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドはB-LCL (+)細胞の細胞内でWT1蛋白質から分解された後に、HLA-DRB1*0405へ提示されて、E04.1細胞の増殖を誘導することが示された。

なお、B-LCL (-)およびB-LCL (+)細胞のアポトーシスの誘導は、浸透圧ショックにより行った。 1×10^6 個の細胞を500 μ lの高浸透圧培地 (0.5 M sucrose, 10% w/v polyethylene glycol 1000, 10 mM HEPESを含むRPMI培地, pH 7.2)に懸濁後、37℃で10分間静置した。その後、あらかじめ37℃にした低浸透圧培地 (60% RPMI, 40% water)によって30倍希釈して37℃で2-3分間静置した。その後、室温で5分間遠心して細胞を回収してアポトーシス誘導細胞として用いた。アポトーシスが誘導されたことは、死細胞染色用蛍光色素Propidium Iodideおよびホスファチジルセリン結合試薬AnnexinVによって確認した。

[0084] 実施例8

WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドによるE04.1細胞の活性化

実施例4と同様の方法でHLA-DRB1*0405陽性の健常人ボランティア血液から誘導した樹状細胞にWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドをパルスし、E04.1細胞と混合して24時間培養した。また、陰性コントロールとしてペプチドをパルスしない樹状細胞とE04.1細胞と混合する群も設定した。24時間培養後、終濃度10 μ g/mlとなるようにBrefeldin Aを添加してE04.1細胞のエクソサイトーシスを阻害した。さらに6時間培養後に、CD4陽性T細胞を回収して2%ホルムアルデヒドを含むPBSで細胞を固定し、0.1%サポニンを含む permeabilization 溶液で処理することで抗体の細胞膜透過性を高めた。その後、処理した細胞にPE標識抗IFN- γ 抗体(BD PharMingen社)およびFITC標識抗IL-4抗体(BD PharMingen社)を反応させて細胞内部を染色した。フローサイトメーターを用いて解析した結果を図9に示す。E04.1細胞は、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドをパルスした樹状細胞との混合培養によってTh-1型のサイトカインIFN- γ の産生が強く誘導されるが、Th-2型のサイトカインIL-4の産生は誘導されないことが示された。

また、未刺激状態のE04.1細胞に抗CD4抗体および抗CXCR3抗体を反応させて染色後、フローサイトメーターによって解析した。結果を図10に示す。E04.1細胞は90%以上がCD4陽性かつCXCR3陽性のTh-1型CD4陽性T細胞であることが示された。なお、CXCR3はケモカインレセプターでありTh-1型免疫細胞に高発現することが知られている。

以上より、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドはWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチド特異的CD4陽性細胞株E04.1細胞を活性化して、Th-1型のサイトカインであるIFN- γ の産生を誘導することが分かった。この結果から、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドは、CD4陽性T細胞をTh-1型に分化・活性化させることが示された。

[0085] 実施例9

WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドによるWT1特異的CTLの誘導および活性化の増強

E04.1細胞を樹立した同一の健常人ボランティア(HLA-A*2402/1101, DRB1*0405/0803)の血液を用いて、実施例4と同様の方法で調製したPBMCを24穴培養プレートの1穴あたりに 3×10^4 個播種し、WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド(配列番号:27、20 μ g/ml)、

WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド(20 μ g/ml) + WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチド(20 μ g/ml)、WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド(20 μ g/ml) + E04.1細胞 (1.5×10^6 個/well)またはWT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド(20 μ g/ml) + WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチド(20 μ g/ml) + E04.1細胞 (1.5×10^6 個/well)となるようにペプチドおよびE04.1細胞を添加して37°Cで7日間培養した。培地には10% AB血清を含むX-VIVO 15TM培地を用いた。なお、ここで用いたWT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドは、HLA-A*2402拘束性のCTL誘導活性を有する癌抗原ペプチドである(WO2004/024175号公報)。

培養7日間後に細胞を回収し、半量を抗CD8抗体(BD PharMingen社)およびWT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド/HLA-A*2402特異的PE標識テトラマーを用いて染色した。フローサイトメーターによる解析結果を図11(A-D)に示す。PBMCをWT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドで刺激した場合、CD8陽性かつWT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド/HLA-A*2402陽性のWT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド特異的CTL前駆体が誘導されることが報告されている(Cancer Immunol Immunother, 51, p614-620 (2002))。PBMCをWT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドのみで刺激した結果、WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド特異的CTL前駆体の割合は0.12%であった(図11-A)。WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドおよびWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドで刺激した結果、WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド特異的CTL前駆体の割合は0.69%に上昇した(図11-B)。WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドおよびE04.1細胞で刺激した結果、WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド特異的CTL前駆体の割合は4.51%に上昇した(図11-C)。WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドおよびE04.1細胞で刺激した結果、WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド特異的CTL前駆体の割合は7.12%に上昇した(図11-D)。

次に、回収した残りの細胞 3×10^5 個を、WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドでパルスした後に30 GyのX線を照射した樹状細胞と6時間混合培養した。培養1時間後に、Brefeldin Aを添加して細胞のエクソサイトーシスを阻害した。さらに5時間培養後、細胞を抗CD8抗体およびWT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド/HLA-A*2402特異的PE標識テトラマーを用いて染色した。その後、実施例8と同様の方法で細胞に固定処理およびpermeabilization溶液による細胞膜透過性亢進処理を行った後、PE標識抗IFN- γ 抗体により細胞内部を染色した。なお陰性コントロールとして、APC-標識抗マウスIgG抗体(BD PharMingen社)による染色も行い、IFN- γ 陽性かつマウスIgG陽性の細胞集団は非特異的染色として除外した。

結果を図12(A-D)に示す。WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド特異的CTL前駆体をWT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプ

チドで6時間刺激すると、CD8陽性かつWT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド/HLA-A*2402陽性かつIFN- γ 陽性の活性化WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド特異的CTLが誘導される。WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドのみで刺激した結果、活性化WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド特異的CTLの割合は17.0%であった(図12-A)。WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドおよびWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドで刺激した結果、活性化WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド特異的CTLの割合は23.3%に上昇した(図12-B)。WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドおよびE04.1細胞で刺激した結果、活性化WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド特異的CTL の割合は25.7%に上昇した(図12-C)。WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドおよびE04.1細胞で刺激した結果、活性化WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド特異的CTL の割合は39.0%に上昇した(図12-D)。

以上の結果より、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドはWT1特異的CTL前駆体の誘導と活性化を増強するヘルパーペプチドであることが示された。同様に、E04.1細胞はWT1特異的CTLの活性化を増強するヘルパーT細胞であり、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドによってそのヘルパー機能は大幅に上昇してWT1特異的CTLの活性化を増強することも示された。

[0086] 実施例10

WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドのpromiscuous性の検討

WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドが、日本人に多いとされるHLA-DRB1*1502分子にも結合し、WT1₃₃₂₋₃₄₇ 特異的CD4陽性T細胞を誘導することのできるpromiscuous helper peptideであるかどうかを解析した。

1.実験方法

1)樹状細胞(DC)の作製

健常人の血液提供者(HLA-DRB1*1502/1403)の末梢血から末梢血単核球(PBMC)を分離し1%AB型血清(Nabi, Miami, FL)、X-VIVO 15培養液(Cambrex社)を用いて6穴プラスチックプレートに 1×10^7 cells/well播き2時間培養した。その後、浮遊細胞を除去し、残った付着細胞を1000 IU/ml IL-4 (PeproTech社)、1000 IU/ml GM-CSF (PeproTech社)、1%AB型血清、X-VIVO 15培養液で培養した。2日目と4日目に培養交換を行いIL-4とGM-CSFを添加し、6日目にTNF- α を100 IU/ml加え、樹状細胞を成熟化させた。

2)WT1₃₃₂₋₃₄₇ 特異的CD4陽性T細胞の誘導

同じ血液提供者からCD4陽性T細胞分離用RosetteSep (StemCell社)を用いてCD4陽性T細胞を分離した。24穴プレートの各ウェルに、このCD4陽性T細胞(3×10^6 個)を入れ、これをWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチド20 μ g/mlでパルスし25Gy放射線照射した自己樹状細胞(3×10^5 個)で刺激し、刺激の次の日にIL-2を20IU/ml添加した。刺激されたCD4陽性T細胞は、同じように一週間おきにWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドを20 μ g/mlでパルスした樹状細胞を用いて刺激を行った。また、2回目の刺激以降は1日おきにIL-2入りの培地で培地交換を行った。計3回の刺激により誘導されたCD4陽性T細胞を実験に用いた。

[0087] 3)増殖アッセイ

増殖アッセイは $[^3\text{H}]$ -thymidine incorporation法により行った。ペプチドで刺激、誘導されたCD4陽性T細胞(3×10^4 個;responder)と、WT1₃₃₂₋₃₄₇、WT1₁₇₂₋₁₈₆、WT1₂₂₅₋₂₄₃の各ペプチドをそれぞれパルスし放射線照射したPBMC(1×10^5 個)をstimulatorとして、96穴プレートで共培養した。また、ネガティブコントロールとしてペプチドをパルスしていないDC(ー)を用いた。共培養して80時間後に $[^3\text{H}]$ -thymidine (Amersham Biosciences社)を37kBq/wellで添加し、さらに16時間インキュベーションして β シンチレーションカウンターで測定した。単位はcount per minute(cpm)で表し、すべてのアッセイはtriplicateでおこなった。

4)フローサイトメリーによるサイトカイン産生の解析

増殖アッセイと同様にCD4陽性T細胞とstimulatorを共培養し、2時間後Brefeldin Aを加えた。その4時間後に細胞を回収し、fixation/permeationを行い、FITC標識抗IL-4抗体(BD Pharmingen社)とPE標識抗IFN- γ 抗体(BD Pharmingen社)で染色し、フローサイトメリーを行った。

5)ELISA法

自己PBMC(6×10^5 個)にWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドをパルスしたものとししないものを用意し、これらを25Gyで放射線照射して、それぞれをWT1₃₃₂₋₃₄₇で誘導したCD4陽性T細胞(6×10^5 個)と共培養した。そして72時間培養後に上清を回収し、ELISAで上清300 μ l中のIL-4、IFN- γ を測定した。

6)TCR レパトアアッセイ

TCR V β repertoire Kit (BECKMAN COULTER社)、FACsort (BECTON DICKINSON社)を用いて、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドで誘導したCD4陽性T細胞のT cell receptorの β 鎖のレパトアを解析した。

[0088] 2.実験結果

健常人の血液提供者 (HLA-DRB1*1502/1403) から分離したCD4陽性T細胞を、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドをパルスした自己の樹状細胞を用いて計3回刺激した。これにより誘導されたCD4陽性T細胞のペプチド特異性をWT1₁₇₂₋₁₈₆、WT1₂₂₅₋₂₄₃、WT1₃₃₂₋₃₄₇ の各ペプチドを用いて増殖アッセイにて検討した。その結果、WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドで誘導されたCD4陽性T細胞は、ペプチドがない場合やWT1₁₇₂₋₁₈₆ や WT1₂₂₅₋₂₄₃ の刺激では増殖しなかったが、WT1₃₃₂₋₃₄₇ で刺激すると約10倍に増殖した (図13)。この結果より、誘導されたCD4陽性T細胞はWT1₃₃₂₋₃₄₇ 特異性を有することが示された。

このWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドで誘導されたCD4陽性T細胞のTCR レパトアアッセイを行った。結果を図14に示す。V β 3を有するものとV β 20を有するものがそれぞれ全体の10%存在し、ドミナントとなっていた。

これらのドミナントとなっていたCD4陽性T細胞をソーティングにより分離し、V β 3を有するものをE15.1 subline、V β 20を有するものをE15.2 sublineと命名した。この2つの株のうちE15.2 sublineの方がよりWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドに対する反応性が高かった (図15)。

さらに、E15.2 sublineをWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドにより刺激し、分泌されるIL-4とIFN- γ を Intracellular stain法によって測定した。その結果、Th-2型サイトカインであるIL-4ではなく、Th-1型サイトカインであるIFN- γ を顕著に産生することが明らかとなった (図16)。また、E15.2 sublineのWT1₃₃₂₋₃₄₇ 特異的な増殖反応はWT1₃₃₂₋₃₄₇ の濃度依存性であった (図17)。これらの結果から、E15.2 sublineはWT1₃₃₂₋₃₄₇ 特異的Th-1型CD4陽性T細胞株であることが明らかとなった。

以上のように、HLA-DRB1*1502分子陽性かつHLA-DRB1*0405分子陰性の健常人のCD4陽性T細胞から、WT1₃₃₂₋₃₄₇ 特異的なTh-1型 CD4陽性T細胞株を誘導することができた。これにより、このCD4陽性T細胞は細胞性免疫に関与し、サイトカインの分泌によりCTLを活性化できると考えられる。このように、CTLを活性化するHLA-class I

拘束性WT1ペプチド(癌抗原ペプチド)にWT1₃₃₂₋₃₄₇を併用することで、抗腫瘍効果をさらに増強できることが示された。

- [0089] 次にHLA-DRB1*1502陽性の健常人(1502/0901)1名と、HLA-DRB1*1502陰性の健常人(1302/0803)1名の末梢血単核球にWT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチドをパルスしたものを stimulatorとしてE15.2 sublineと共培養し、WT1₃₃₂₋₃₄₇特異的な増殖を増殖アッセイにより調べた。結果を図18に示す。HLA-DRB1*1502陽性の健常人ではWT1₃₃₂₋₃₄₇特異的な増殖が見られたが、HLA-DRB1*1502陰性の健常人では増殖は見られなかった(図18)。このことから、E15.2 sublineのWT1₃₃₂₋₃₄₇特異的な増殖はHLA-DRB1*1502拘束性であることが示された。

以上のように、WT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチド特異的なTh-1型CD4陽性T細胞株であるE15.2 sublineを用いた解析により、WT1₃₃₂₋₃₄₇は日本人に最も多いHLA-DRB1*0405分子だけでなく、日本人に3番目に多いHLA-DRB1*1502分子にも結合するpromiscuous helper peptideであることが示された。

産業上の利用可能性

- [0090] 本発明により、WT1由来のHLA-DRB1*0405結合性抗原ペプチド、当該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、これらペプチドやポリヌクレオチドを含むヘルパーT細胞の誘導剤などが提供される。本発明のヘルパーT細胞の誘導剤は、癌ワクチンの作用増強剤として有用である。本発明の癌ワクチンの作用増強剤は、HLA-DRB1*0405陽性の多くの癌患者に適用可能であり、特にWT1ワクチンの作用増強剤として有用である。

図面の簡単な説明

- [0091] [図1]WT1由来のペプチドWT1₃₃₂₋₃₄₇で刺激したCD4陽性T細胞(ヘルパーT細胞)と各種樹状細胞との反応性を調べた結果を示す。図中、「無処理」はペプチドをパルスしていない樹状細胞との反応性を、「PHA」は樹状細胞の代わりにPHAで処理したCD4陽性T細胞の結果を、「WT1₁₇₂₋₁₈₆パルス」はWT1₁₇₂₋₁₈₆ペプチドをパルスした樹状細胞との反応性を、「WT1₂₂₅₋₂₄₃パルス」はWT1₂₂₅₋₂₄₃ペプチドをパルスした樹状細胞との反応性を、「WT1₃₃₂₋₃₄₇パルス」はWT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチドをパルスした樹状細胞との反応性をそれぞれ示す。また縦軸は、CD4陽性T細胞に取り込まれた³H-チミジン量(

cpm)を示す。

[図2]WT1由来のペプチドWT1₃₃₂₋₃₄₇をパルスした樹状細胞に対するG2細胞株の反応性を調べた結果を示す。図中、「無処理」はペプチドをパルスしていない樹状細胞を用いた結果を、「WT1₃₃₂₋₃₄₇ パルス」はWT1₃₃₂₋₃₄₇をパルスした樹状細胞を用いた結果を示す。また縦軸は、G2細胞株に取り込まれた³H-チミジン量(cpm)を示す。

[図3]WT1遺伝子を発現するB-LCL(+)細胞に対するG2細胞株の反応性を調べた結果を示す。図中、「B-LCL(-)」はWT1遺伝子を発現していないB-LCL(-)細胞を用いた結果を、「B-LCL(+)」はWT1遺伝子を発現するB-LCL(+)細胞を用いた結果を、また「B-LCL(+) + 抗HLA-DR抗体」は抗HLA-DR抗体で処理したB-LCL(+)を用いた結果を示す。また縦軸は、G2細胞株に取り込まれた³H-チミジン量(cpm)を示す。

[図4]WT1由来のペプチドWT1₃₃₂₋₃₄₇をパルスした樹状細胞に対するE04.1細胞株の反応性を調べた結果を示す。図中、「-」はペプチドをパルスしていない樹状細胞を用いた結果を示し、「332」はWT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチドをパルスした樹状細胞を用いた結果を示す。縦軸は、E04.1細胞株に取り込まれた³H-チミジン量(cpm)を示す。

[図5]WT1由来のペプチドWT1₃₃₂₋₃₄₇をパルスした刺激細胞を各種HLA阻害抗体で処理した場合のE04.1細胞株の反応性を調べた結果を示す。刺激細胞には実施例3においてHLA-DRB1*0405陽性の健常人ボランティア血液から樹立したB細胞株B-LCL (-)細胞を用いた。図中、「-」はペプチドをパルスしていない刺激細胞を用いた結果を、「332」はWT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチドをパルスした刺激細胞を用いた結果を示す。「332+ α-classI」はWT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチドと抗HLA-classI抗体で処理した刺激細胞、「332+ α-DR」はWT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチドと抗HLA-DR抗体で処理した刺激細胞、「332+ α-DQ」はWT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチドと抗HLA-DQ抗体で処理した刺激細胞を用いた結果を示す。なお、「332+mIgG」はWT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチドと阻害抗体の陰性コントロールとして抗マウスIgG抗体で処理した刺激細胞を用いた結果を示す。縦軸は、E04.1細胞株に取り込まれた³H-チミジン量(cpm)を示す。

[図6]WT1由来のペプチドWT1₃₃₂₋₃₄₇をパルスしたHLA-DRB1*0405陽性または陰性のPBMCに対するE04.1細胞株の反応性を調べた結果を示す。図中、「-」はペプチドをパルスしていないPBMCを用いた結果を、「332」はWT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチドをパルスした

PBMCを用いた結果を示す。DonorのHLA-DRB1の遺伝型は、Donor 1 (HLA-DRB1*0405/0803)、Donor 2 (HLA-DRB1*0405/0101)、Donor3 (HLA-DRB1*0101/1001) およびDonor 4 (HLA-DRB1*1201/0802)である。縦軸は、E04.1細胞株に取り込まれた $[^3\text{H}]$ -チミジン量(cpm)を示す。

[図7]WT1遺伝子を発現するB-LCL (+)細胞に対するE04.1細胞株の反応性を調べた結果を示す。図中、「B-LCL (-)」はWT1遺伝子を発現していないB-LCL (-)細胞を刺激細胞に用いた結果を、「B-LCL (+)」はWT1遺伝子を発現するB-LCL (+)細胞を刺激細胞に用いた結果を示す。縦軸は、E04.1細胞株に取り込まれた $[^3\text{H}]$ -チミジン量(cpm)を示す。

[図8]アポトーシスを誘導したB-LCL (+)細胞をパルスした樹状細胞に対するE04.1細胞株の反応性を調べた結果を示す。図中、「apoptotic B-LCL (+)」はWT1遺伝子を発現するB-LCL (+)細胞にアポトーシスを誘導後、樹状細胞にパルスする場合を示す。「apoptotic B-LCL (-)」はWT1遺伝子を発現しないB-LCL (-)細胞にアポトーシスを誘導後、樹状細胞にパルスする場合を示す。図中、「E04.1+」はE04.1細胞を樹状細胞と混合培養した場合を、「E04.1-」はE04.1細胞を混合培養しない場合を示す。縦軸は、E04.1細胞株に取り込まれた $[^3\text{H}]$ -チミジン量(cpm)を示す。

[図9]WT1由来のペプチドWT1₃₃₂₋₃₄₇をパルスした樹状細胞に対するE04.1細胞株のサイトカイン産生について調べた結果を示す。図中、「-」はペプチドをパルスしていない樹状細胞を用いた結果を、「332」はWT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチドをパルスした樹状細胞を用いた結果を示す。縦軸は、IL-4(白棒)またはIFN- γ (黒棒)の産生が認められたE04.1細胞の割合を示す。

[図10]E04.1細胞株を抗CD4抗体および抗CXCR3抗体で染色してフローサイトメーターで解析した結果を示す。図中、横軸はCD4陽性細胞を、縦軸はCXCR3陽性細胞を示す。CD4陽性かつCXCR3陽性細胞の割合は、90.1%であった。

[図11]WT1由来のペプチドWT1₃₃₂₋₃₄₇がWT1特異的CTLの誘導に与える影響を検討した結果を示す。健常人ボランティア(HLA-A*2402/1101, DRB1*0405/0803)由来PBMCを、WT1₂₃₅₋₂₄₃ペプチド(A)、WT1₂₃₅₋₂₄₃ペプチド+ WT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチド(B)、WT1₂₃₅₋₂₄₃ペプチド+ E04.1細胞 (C)およびWT1₂₃₅₋₂₄₃ペプチド+ WT1₃₃₂₋₃₄₇ペプチド+ E04.1

細胞 (D)の刺激条件で7日間培養した。その後、回収した細胞の半量を用いて、WT1

特異的CTL前駆体の割合をフローサイトメーターにより解析した。横軸はCD8陽性の細胞を示し、縦軸はWT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド/HLA-A*2402陽性の細胞を示す。

[図12]WT1由来のペプチドWT1₃₃₂₋₃₄₇ がWT1特異的CTLの活性化に与える影響を検討した結果を示す。前記図11に示す実験において回収した残り半量の細胞をWT1

ペプチドにより6時間刺激した後に、細胞内IFN- γ を染色した。縦軸は細胞内IFN- γ 陽性細胞、横軸は抗マウスIgG抗体陽性細胞を示す。図中、EはWT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド、FはWT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド+ WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチド、GはWT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド+ E04.1細胞、HはWT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド+ WT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチド+ E04.1細胞による刺激の結果を示す。

[図13]WT1由来のペプチドWT1₃₃₂₋₃₄₇ で刺激したCD4陽性T細胞と各種樹状細胞との反応性を調べた結果を示す。図中、「-」はペプチドをパルスしていない樹状細胞との反応性を、「332」はWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドをパルスした樹状細胞との反応性を、「172」はWT1₁₇₂₋₁₈₆ ペプチドをパルスした樹状細胞との反応性を、「225」はWT1₂₂₅₋₂₄₃ ペプチドをパルスした樹状細胞との反応性をそれぞれ示す。縦軸は、CD4陽性T細胞に取り込まれた ^3H -チミジン量(cpm)を示す。実験群間で統計的な有意差が認められた場合は**、有意差が認められなかった場合はn.s.と表示した。

[図14]WT1由来のペプチドWT1₃₃₂₋₃₄₇ で刺激したCD4陽性T細胞のTCRレパトア解析の結果を示す。TCRの各種V β 鎖特異的な抗体で細胞を染色し、フローサイトメリーで分析した。上図では、4分割した領域の右下の細胞集団がV β 3陽性細胞を示す。また、下図では4分割した領域の右下の細胞集団がV β 20陽性細胞を示す。

[図15]WT1由来のペプチドWT1₃₃₂₋₃₄₇ をパルスした自己PBMCに対するE15.1細胞株またはE15.2細胞株の反応性を調べた結果を示す。図中、「-」はペプチドをパルスしていない自己PBMCを用いた結果を示し、「332」はWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドをパルスした自己PBMCを用いた結果を示す。縦軸は、分離した細胞株に取り込まれた ^3H -チミジン量(cpm)を示す。A)はE15.1細胞株を用いた場合、B)はE15.2細胞株を用いた場合の結果を示す。図中**は、実験群間で統計的な有意差が認められたことを示す。

[図16]WT1由来のペプチドWT1₃₃₂₋₃₄₇ をパルスした自己PBMCに対するE15.2細胞株

のサイトカイン産生について調べた結果を示す。図中、「-」はペプチドをパルスしていない樹状細胞を用いた結果を、「332」はWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドをパルスした自己PBMCを用いた結果を示す。縦軸は、IL-4(白棒)またはIFN- γ (黒棒)の産生が認められたE15.2細胞の割合を示す。

[図17]WT1由来のペプチドWT1₃₃₂₋₃₄₇ の自己PBMCへのパルス濃度とE15.2 細胞株の反応性について調べた結果を示す。縦軸は、E15.1細胞株に取り込まれた[³H]-チミジン量(cpm)を示す。横軸は自己PBMCへのWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドのパルス濃度を示す。

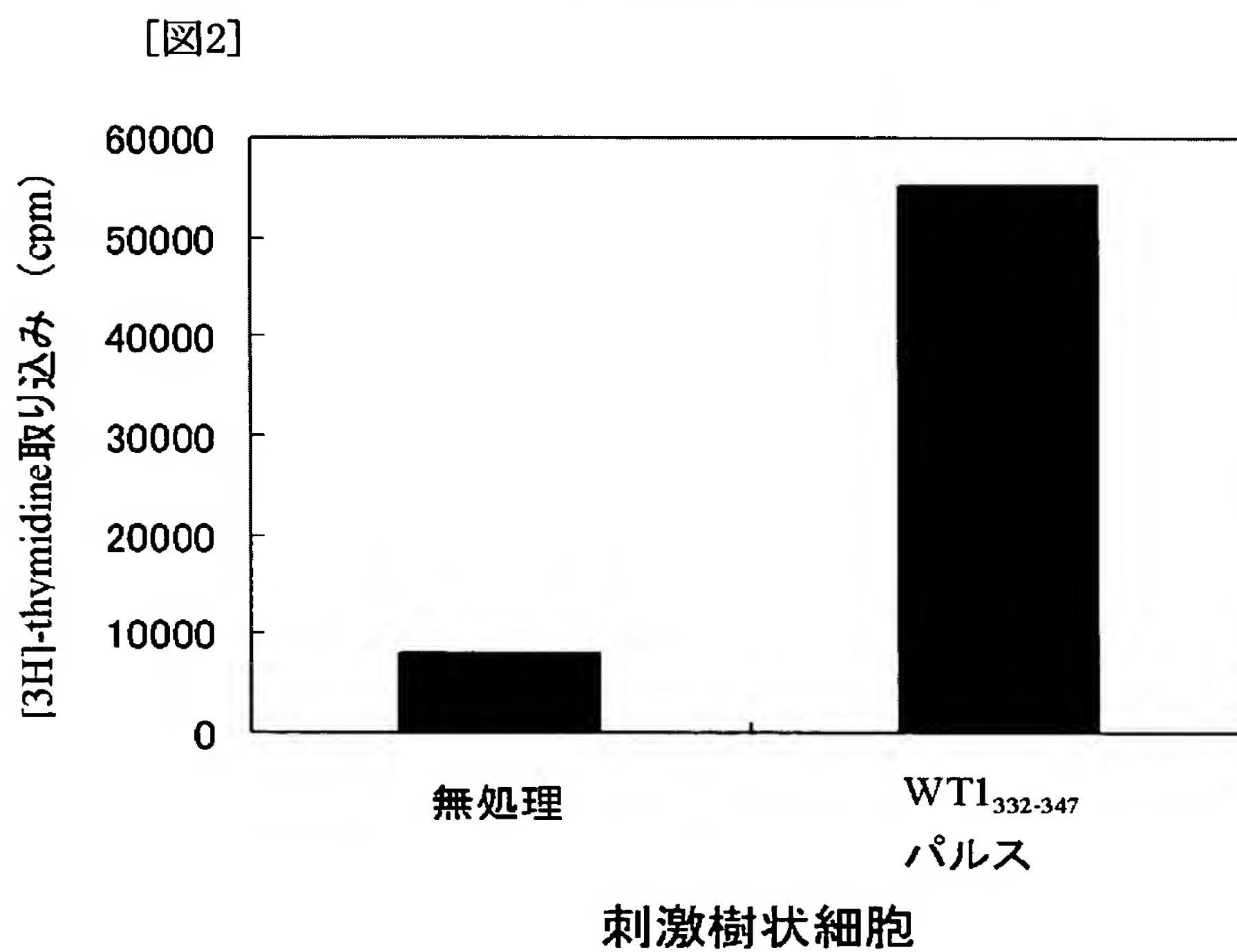
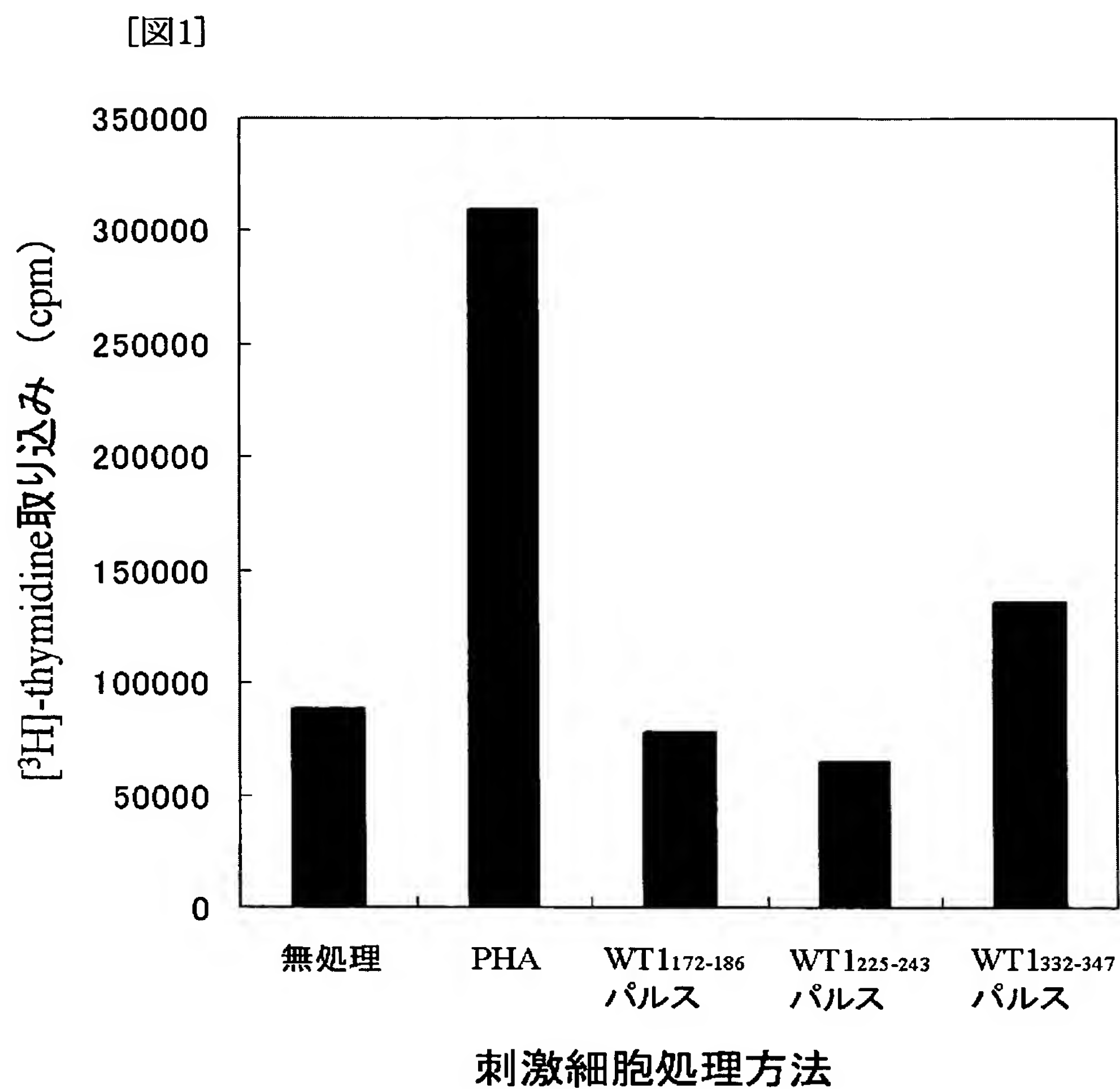
[図18]WT1由来のペプチドWT1₃₃₂₋₃₄₇ をパルスしたHLA-DRB1*1502陽性または陰性のPBMCに対するE15.2細胞株の反応性を調べた結果を示す。図中、「-」はペプチドをパルスしていないPBMCを用いた結果を、「332」はWT1₃₃₂₋₃₄₇ ペプチドをパルスしたPBMCを用いた結果を示す。A)はHLA-DRB1*1502陽性の健常人由来のPBMCを用いた場合、BはHLA-DRB1*1502陰性の健常人由来のPBMCを用いた場合を示す。縦軸は、E15.2細胞株に取り込まれた[³H]-チミジン量(cpm)を示す。実験群間で統計的な有意差が認められた場合は**、有意差が認められなかった場合はn.s.と表示した。

請求の範囲

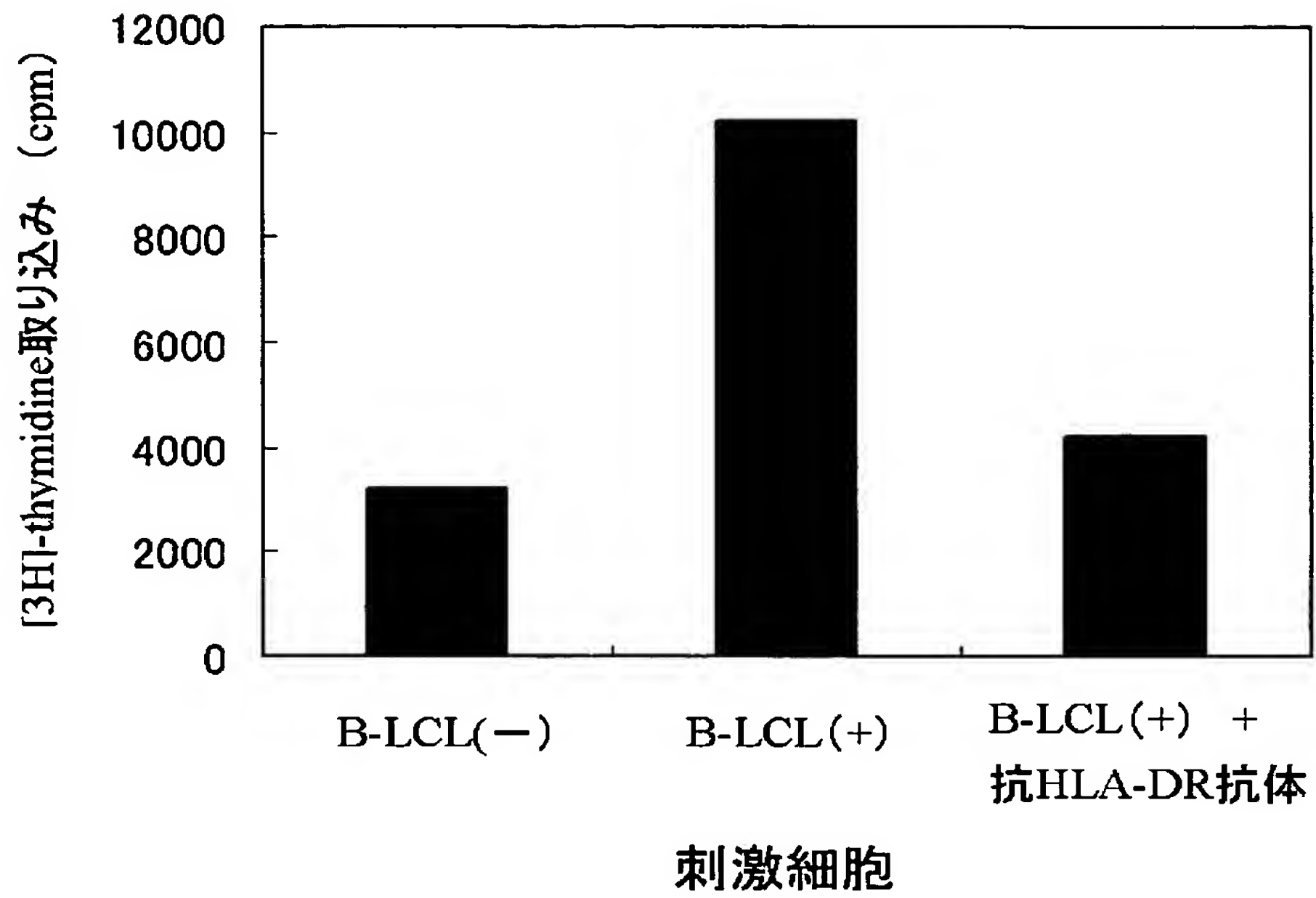
- [1] 配列番号:1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列における連続する10〜25アミノ酸からなるペプチドであって、HLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導するペプチド。
- [2] 配列番号:2〜23のいずれか記載のアミノ酸配列を含有する、請求項1記載のペプチド。
- [3] 配列番号:24に記載のアミノ酸配列を含有する、請求項2記載のペプチド。
- [4] 配列番号:2〜23のいずれか記載のアミノ酸配列の第1位、第4位、第6位および／または第9位のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含有する10〜25アミノ酸からなるペプチドであって、HLA-DRB1*0405に結合してヘルパーT細胞を誘導するペプチド。
- [5] 配列番号:2〜23のいずれか記載のアミノ酸配列の第1位、第4位、第6位および／または第9位のアミノ酸残基がそれぞれ以下の中から選択されるいずれかのアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含有する、請求項4記載のペプチド:
- 第1位:フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン;
- 第4位:バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸;
- 第6位:アスパラギン、セリン、スレオニン、グルタミン、リジン、アスパラギン酸;
- 第9位:アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン。
- [6] 配列番号:24に記載のアミノ酸配列の第3位、第6位、第8位および／または第11位のアミノ酸残基がそれぞれ以下の中から選択されるいずれかのアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含有する、請求項5記載のペプチド:
- 第3位:フェニルアラニン、トリプトファン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、
- 第6位:バリン、イソロイシン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、
- 第8位:アスパラギン、セリン、スレオニン、グルタミン、リジン、アスパラギン酸、
- 第11位:アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン。
- [7] 請求項1〜6のいずれか記載のペプチドと癌抗原ペプチドとを含有するペプチド。
- [8] 請求項1〜7のいずれか記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド。

- [9] 請求項8記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。
- [10] 請求項9記載の発現ベクターを含有する細胞。
- [11] 請求項10記載の細胞を、ペプチドの発現可能な条件下で培養することを特徴とする、請求項1〜7いずれか記載のペプチドの製造方法。
- [12] 請求項1〜6のいずれか記載のペプチドに特異的に結合する抗体。
- [13] 請求項1〜7のいずれか記載のペプチド、請求項9記載の発現ベクター、または請求項10記載の細胞と、薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物。
- [14] 癌の治療剤または予防剤である、請求項13記載の医薬組成物。
- [15] 請求項1〜6のいずれか記載のペプチド、請求項1〜6のいずれか記載のペプチドにかかる請求項9記載の発現ベクター、または請求項1〜6のいずれか記載のペプチドにかかる請求項10記載の細胞と、薬学的に許容される担体とを含有する、ヘルパーT細胞誘導剤である、請求項13記載の医薬組成物。
- [16] 請求項1〜6のいずれか記載のペプチド、請求項1〜6のいずれか記載のペプチドにかかる請求項9記載の発現ベクター、または請求項1〜6のいずれか記載のペプチドにかかる請求項10記載の細胞と、薬学的に許容される担体とを含有する、癌ワクチンの作用増強剤である、請求項13記載の医薬組成物。
- [17] 請求項7記載のペプチド、請求項7記載のペプチドにかかる請求項9記載の発現ベクター、または請求項7記載のペプチドにかかる請求項10記載の細胞と、薬学的に許容される担体とを含有する、癌の治療剤または予防剤である、請求項13記載の医薬組成物。
- [18] 請求項1〜7のいずれか記載のペプチド、請求項9記載の発現ベクター、または請求項10記載の細胞の、癌の治療または予防剤の製造における使用。
- [19] 癌を治療または予防するための方法であって、請求項1〜7のいずれか記載のペプチド、請求項9記載の発現ベクター、または請求項10記載の細胞を、それを必要とする対象に投与する方法。
- [20] 請求項1〜6のいずれか記載のペプチドと癌抗原ペプチドを組み合わせてなる医薬組成物。
- [21] 癌を治療または予防するための、請求項20記載の医薬組成物。

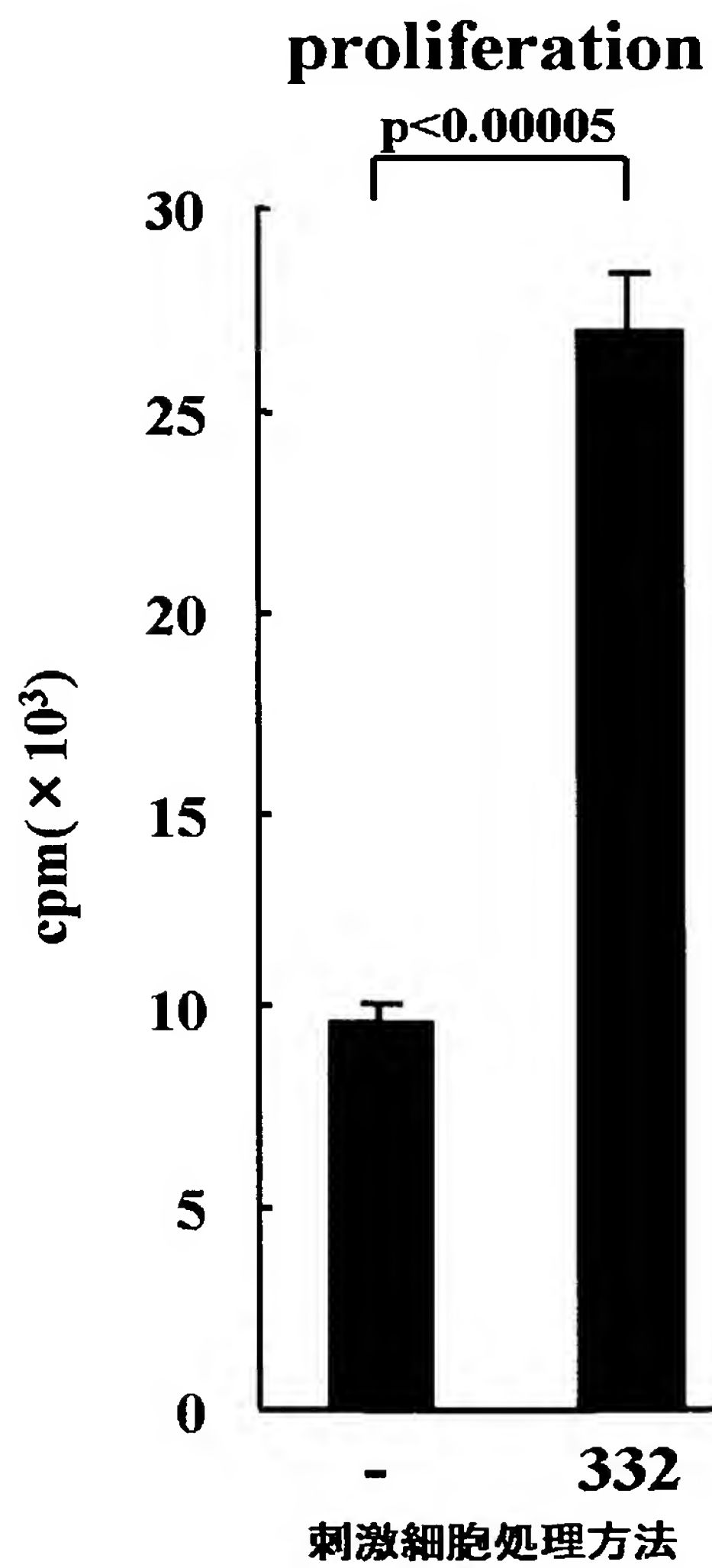
- [22] 請求項1〜6のいずれか記載のペプチドおよび薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物と、癌抗原ペプチドおよび薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物とを含む、癌の治療または予防のためのキット。
- [23] 請求項1〜6のいずれか記載のペプチドと癌抗原ペプチドとの組み合わせの、癌の治療または予防剤の製造における使用。
- [24] 癌を治療または予防するための方法であって、請求項1〜6のいずれか記載のペプチドと癌抗原ペプチドとを組み合わせ、それを必要とする対象に投与方法。



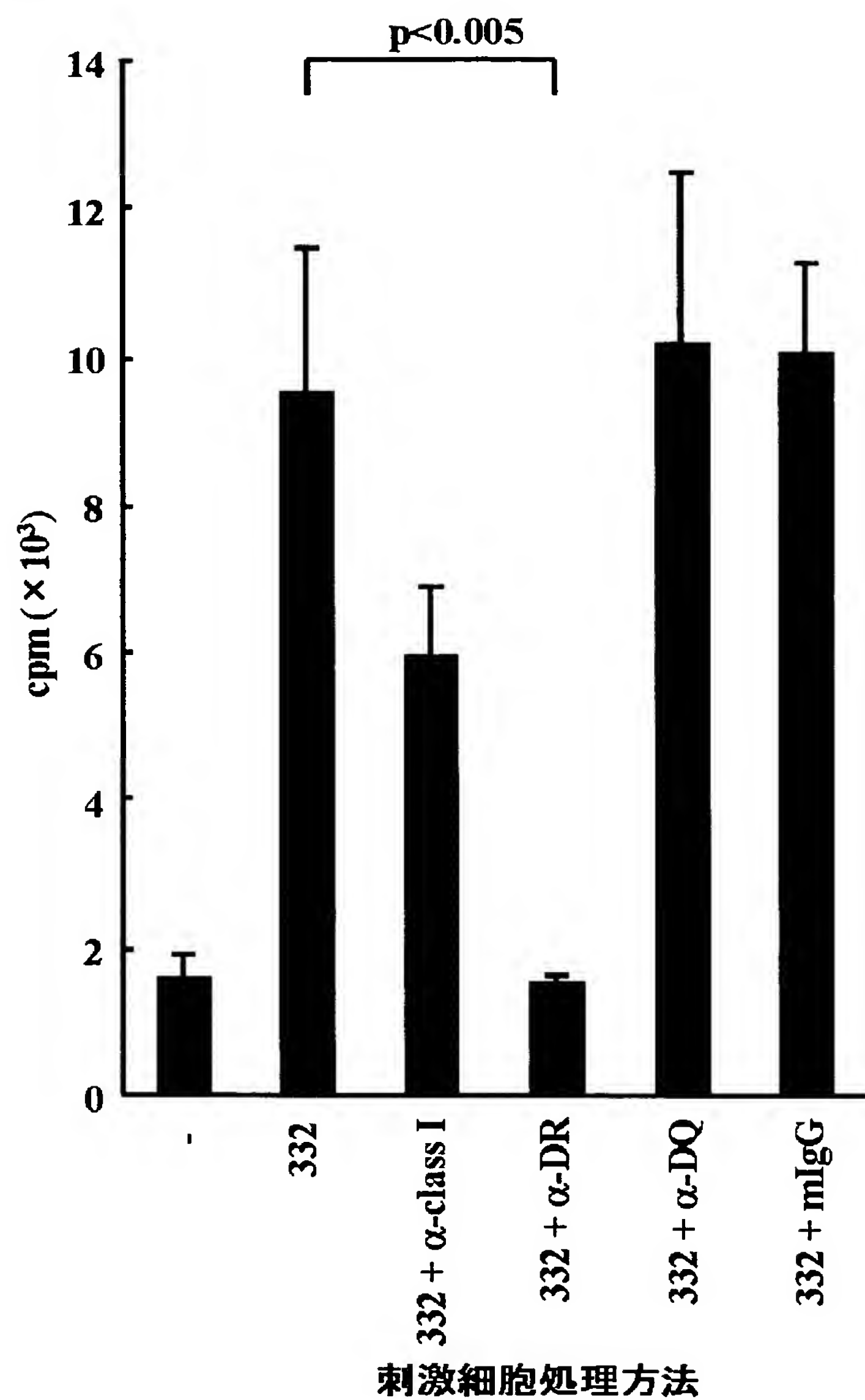
[図3]



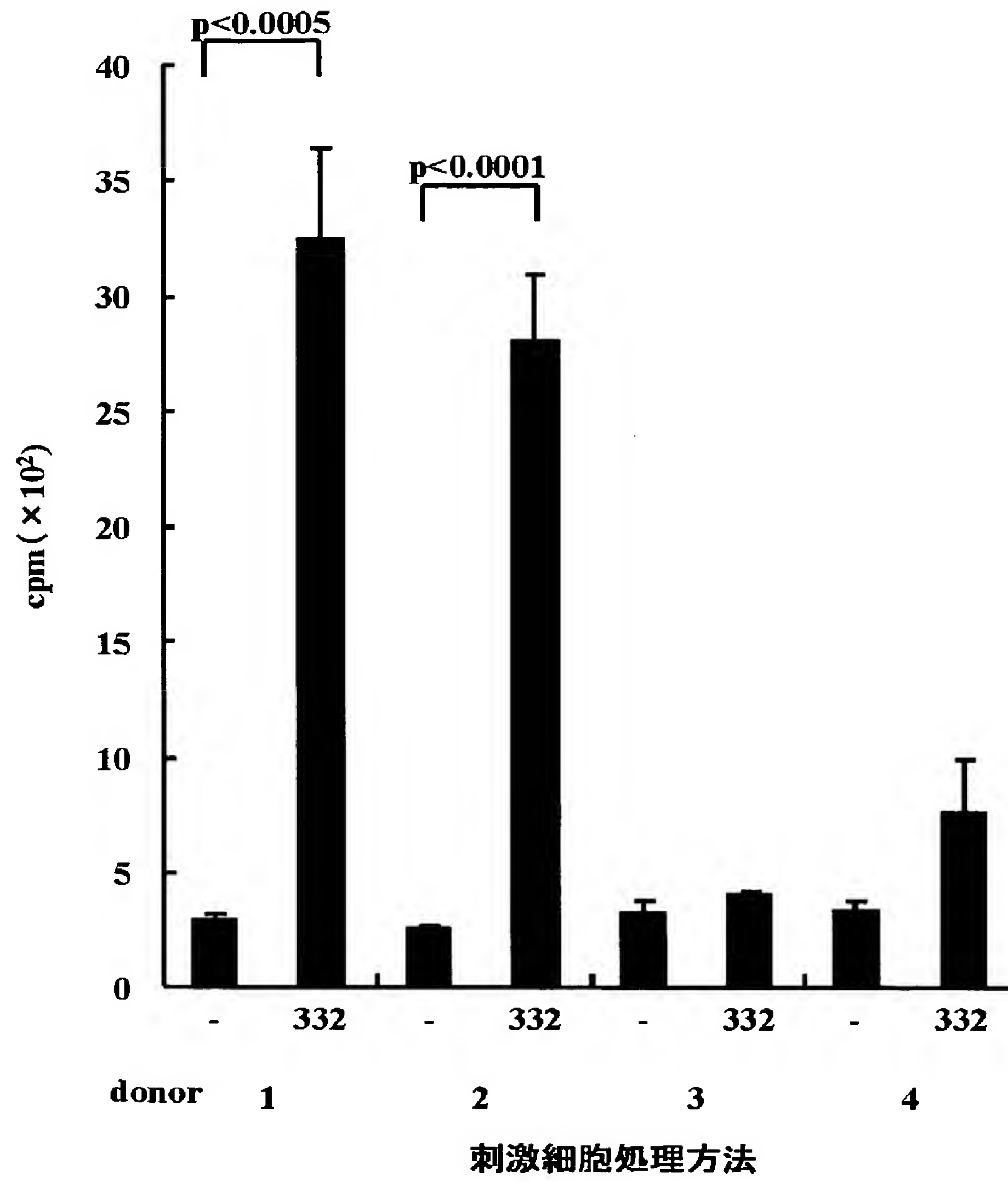
[図4]



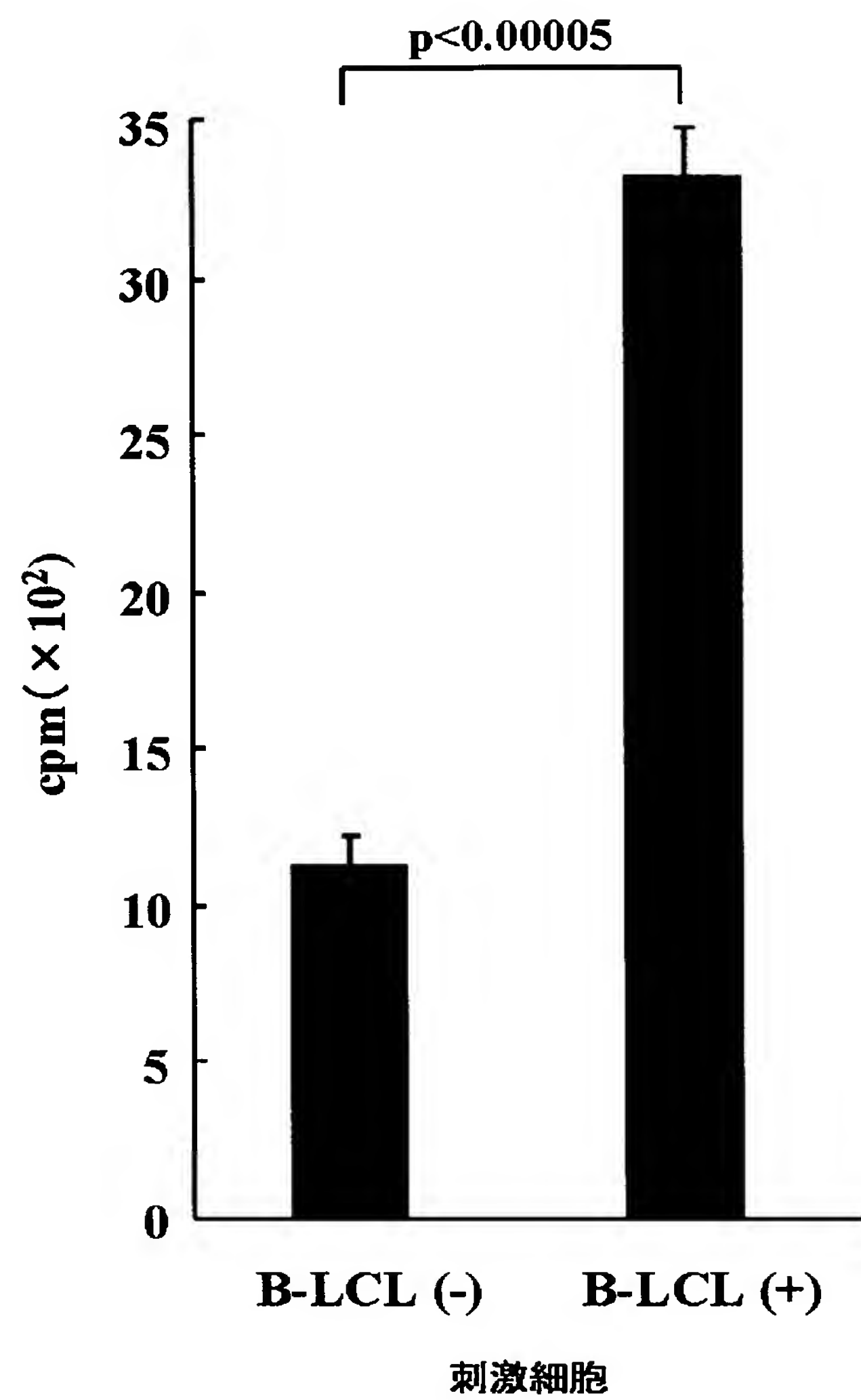
[図5]



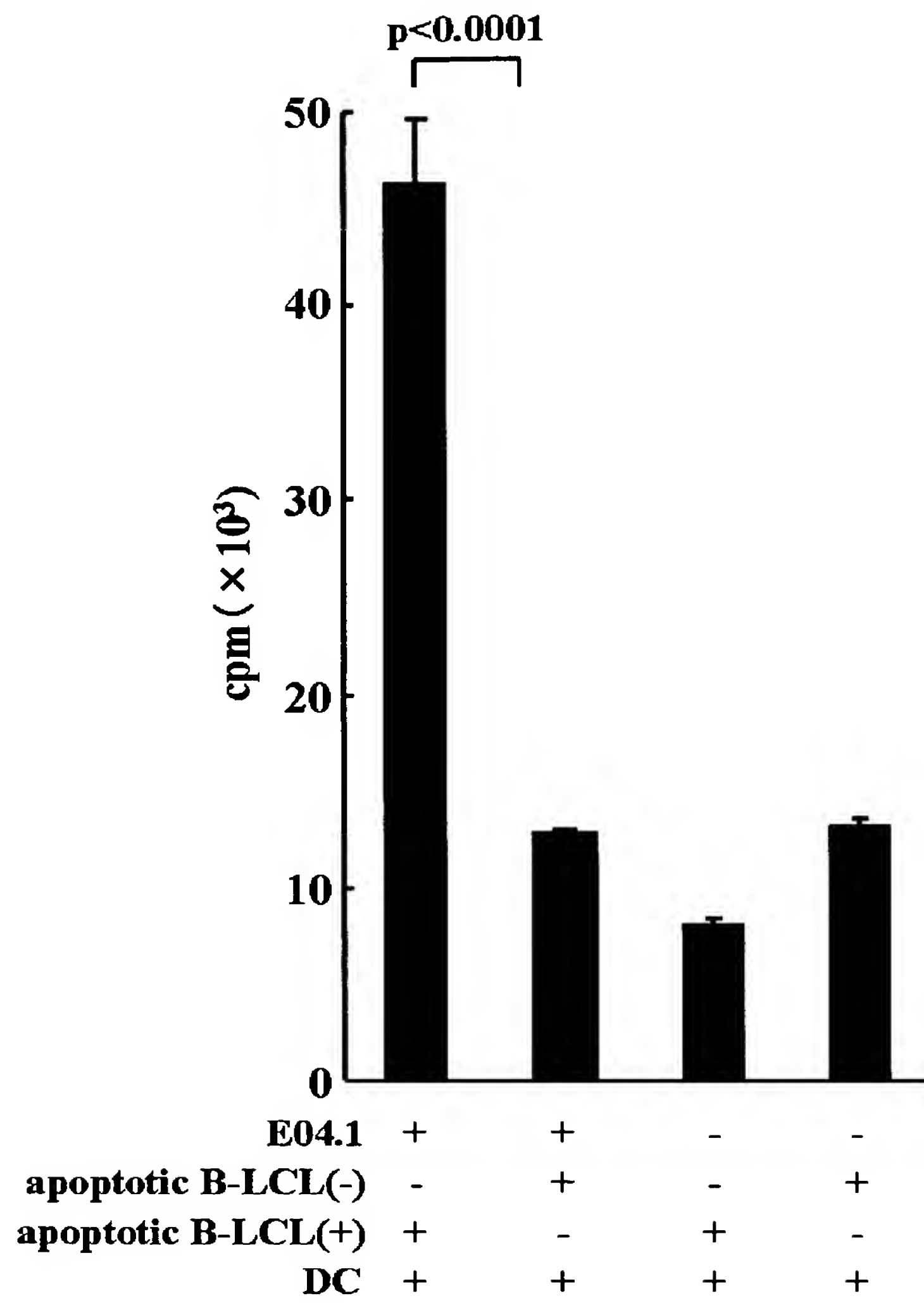
[図6]



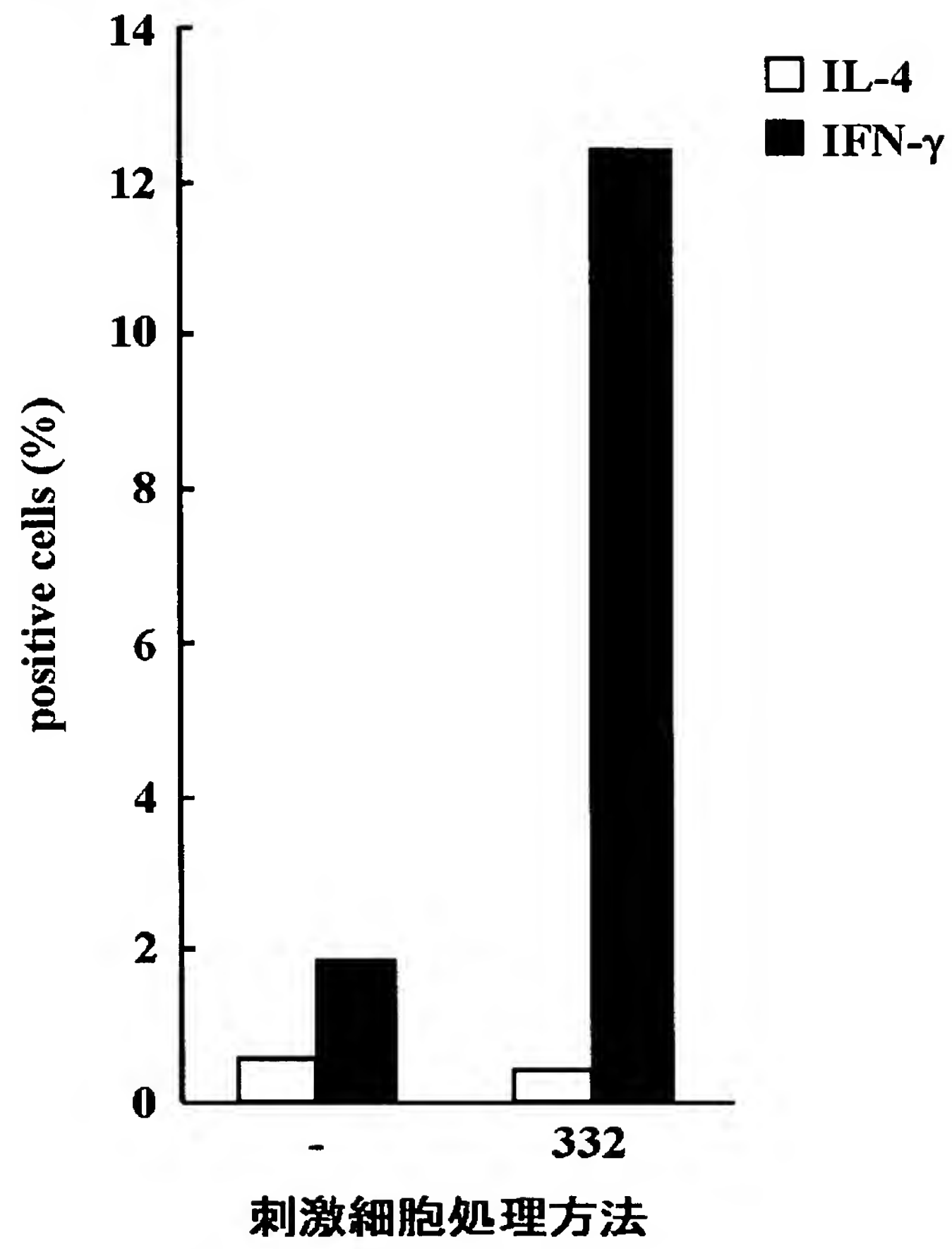
[図7]



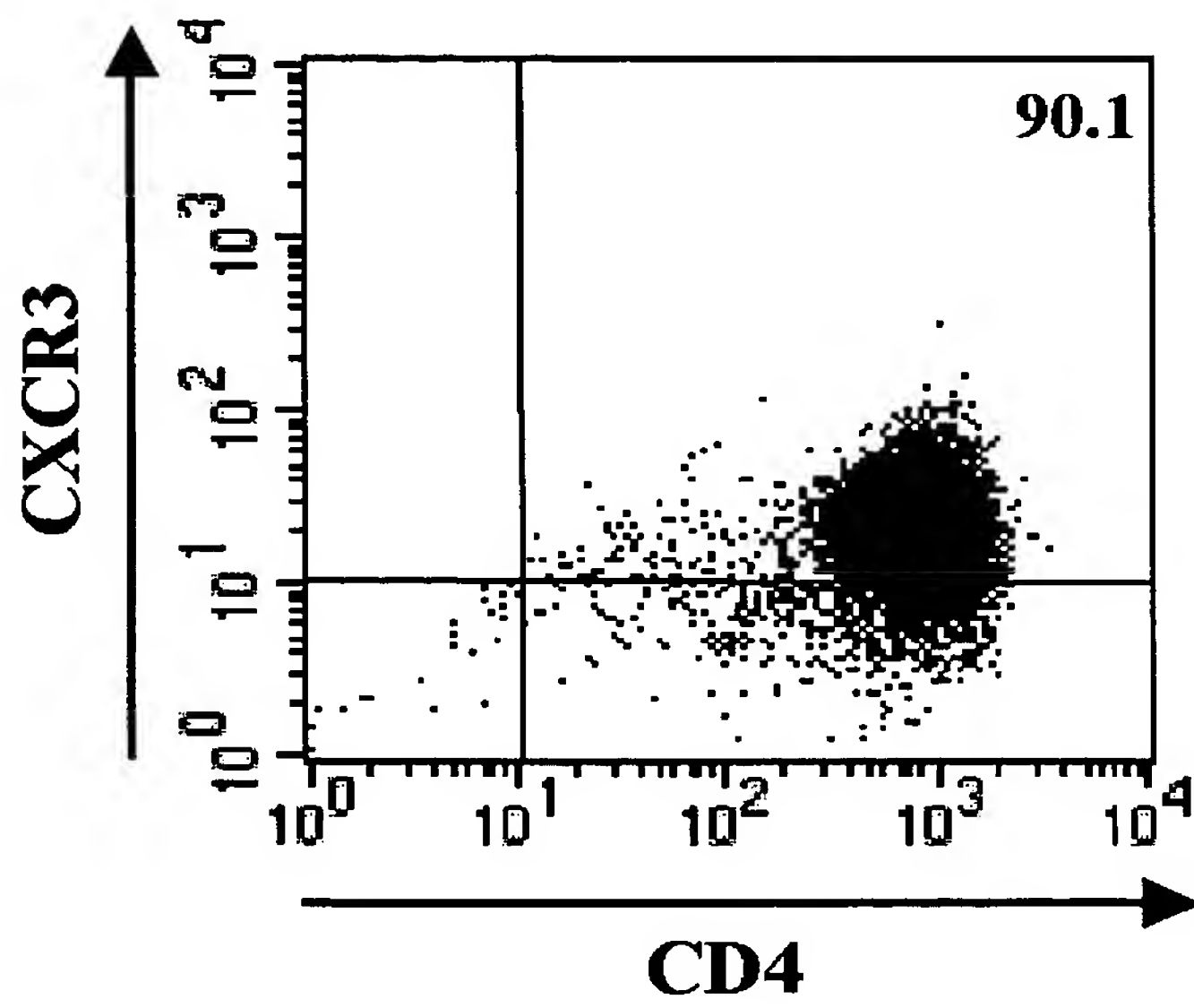
[図8]



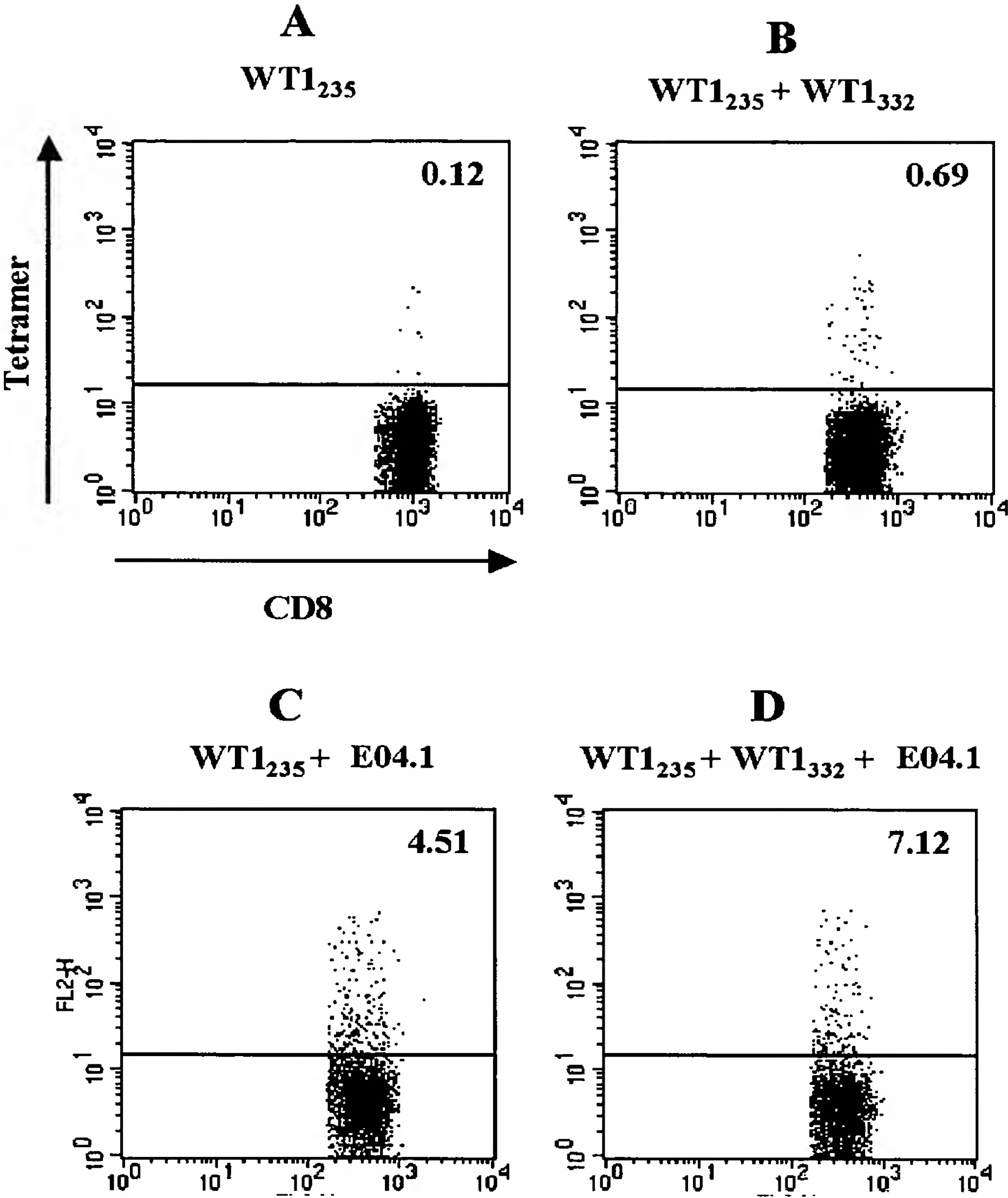
[図9]



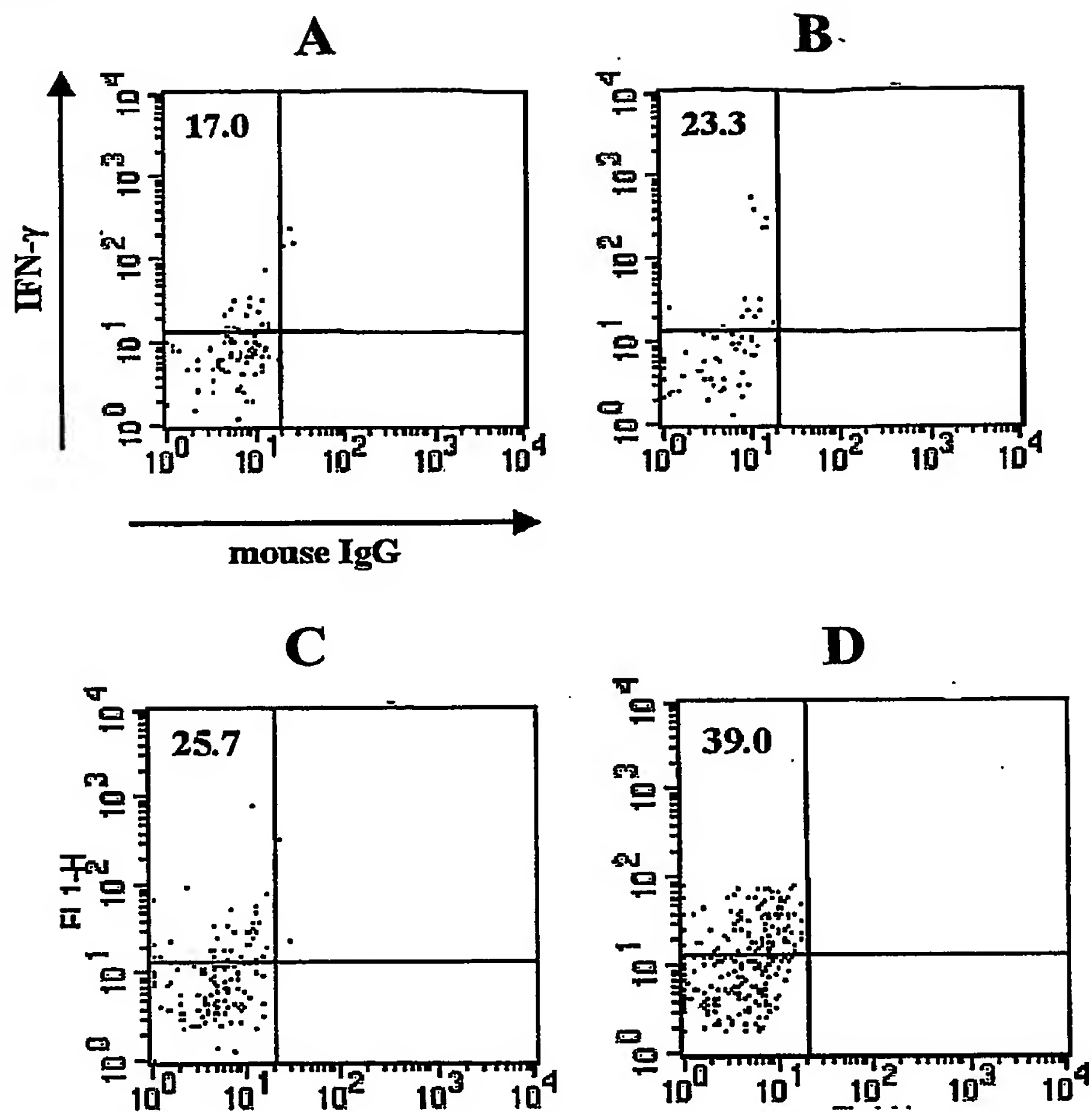
[図10]



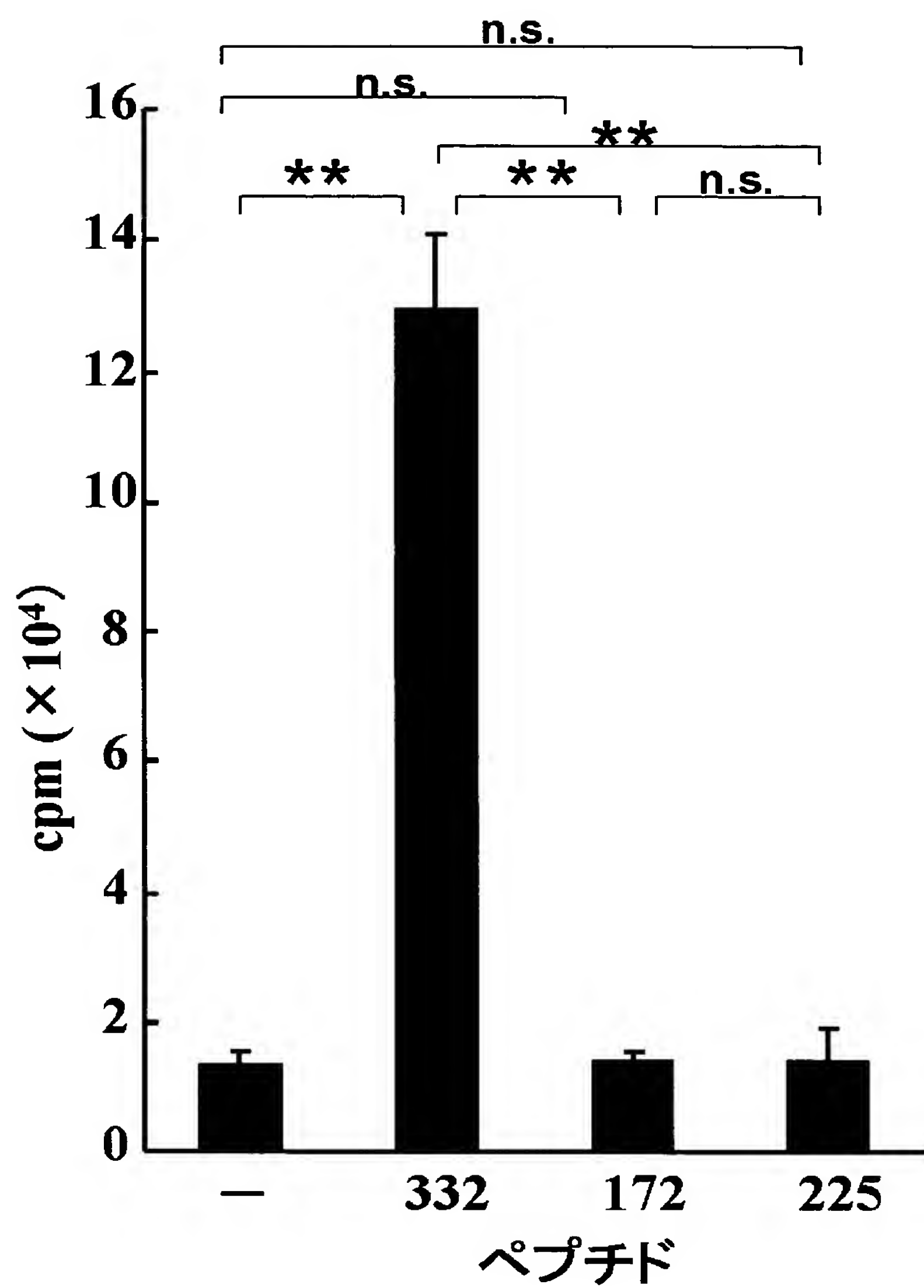
[図11]



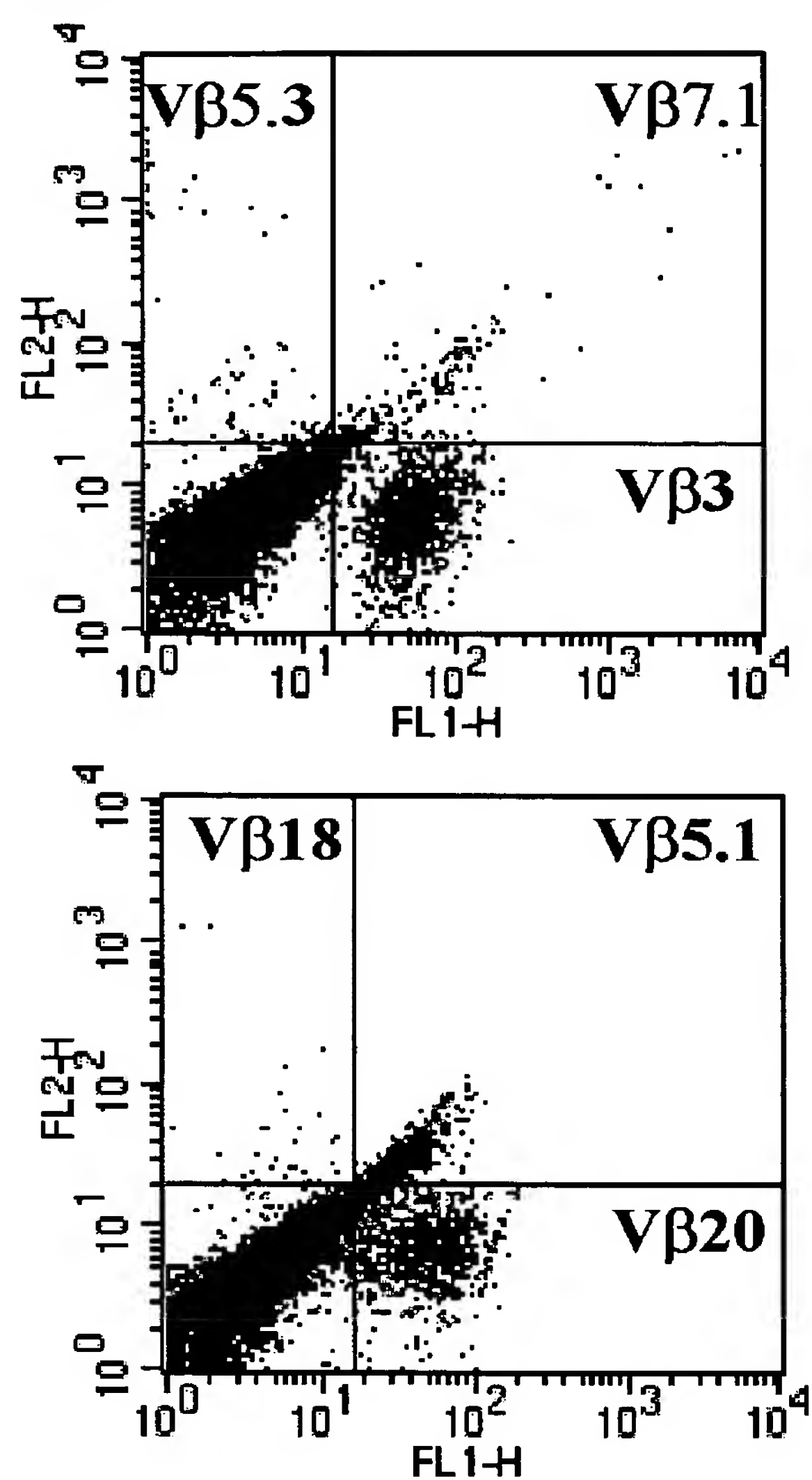
[図12]



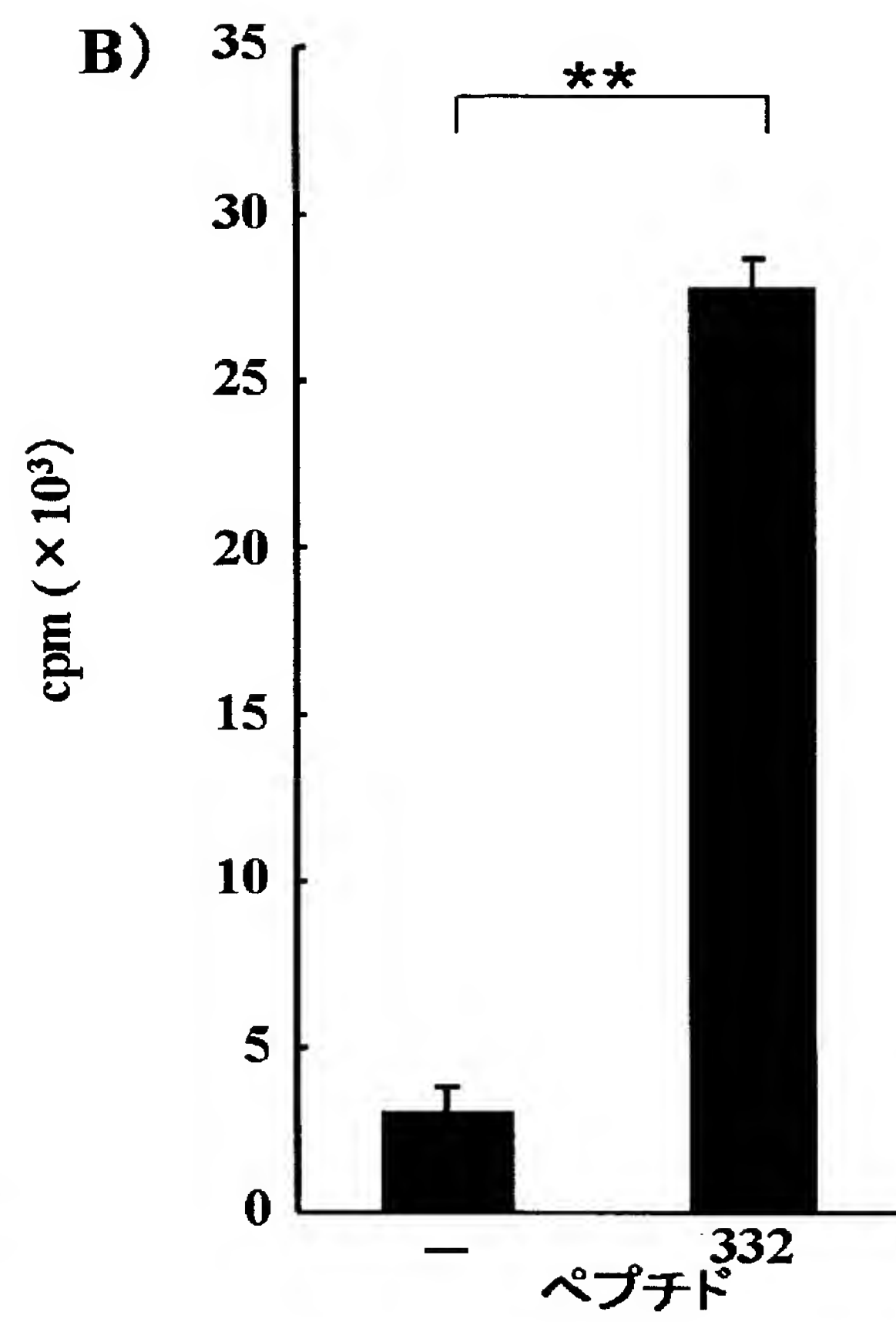
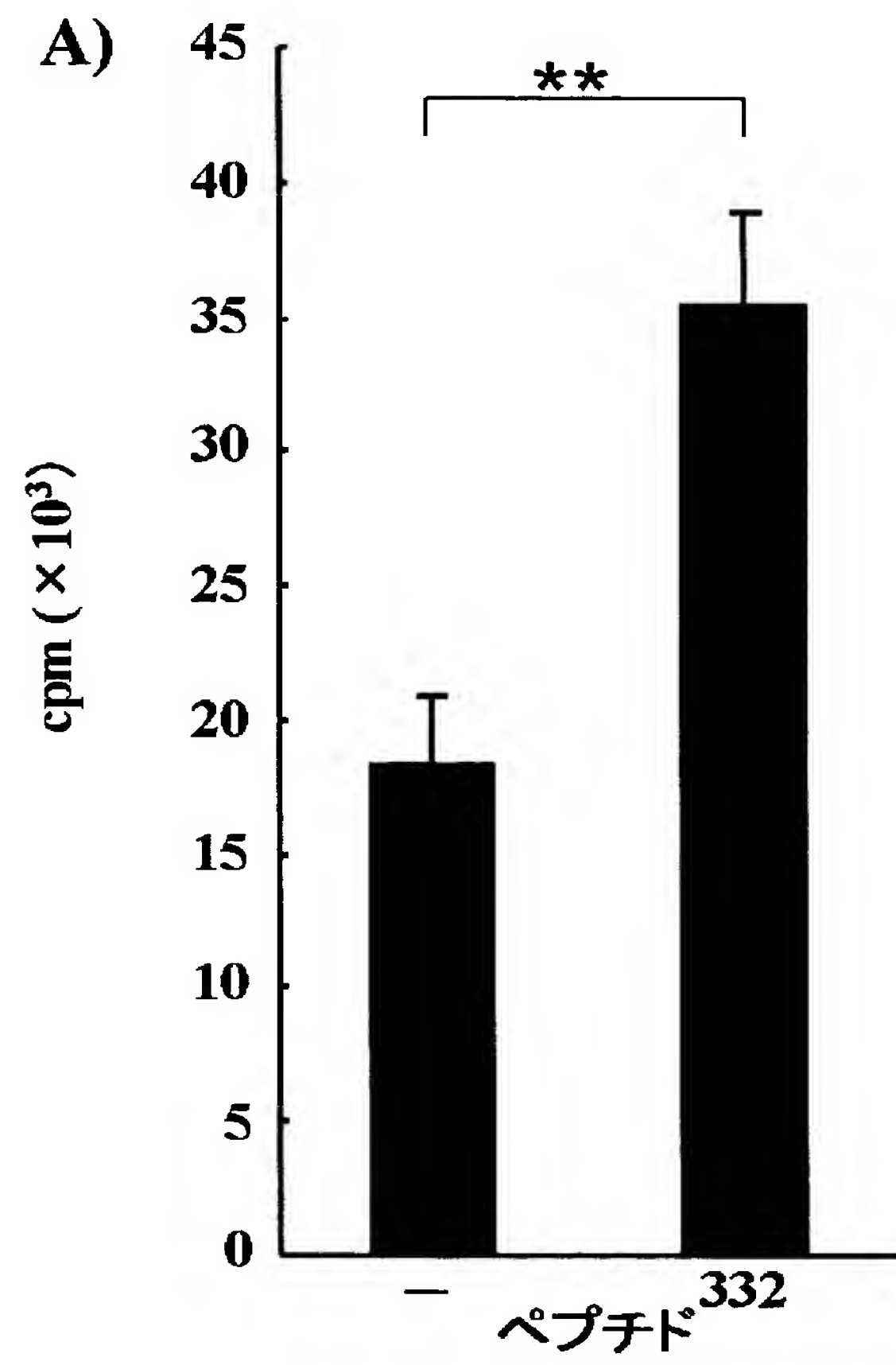
[図13]



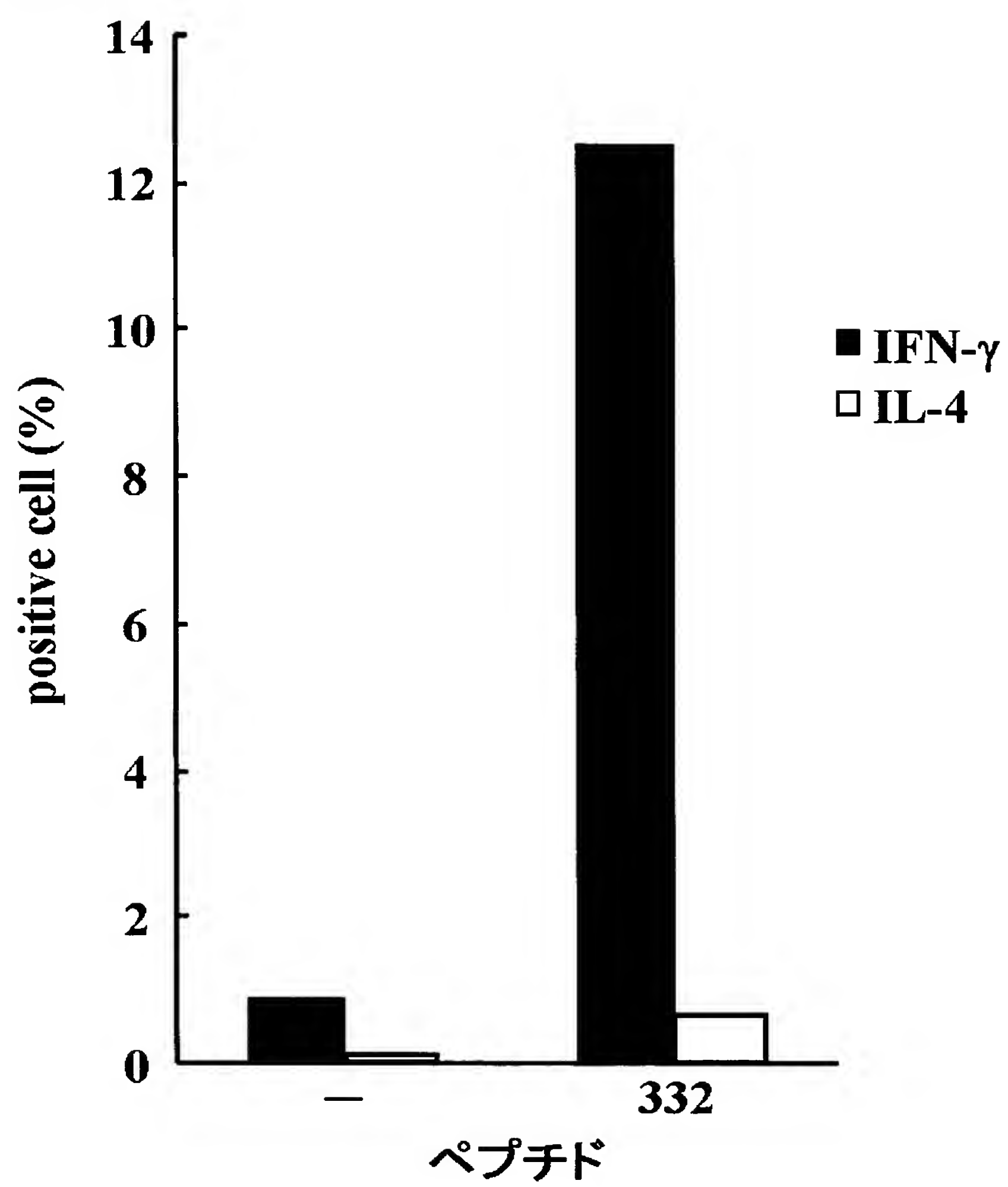
[図14]



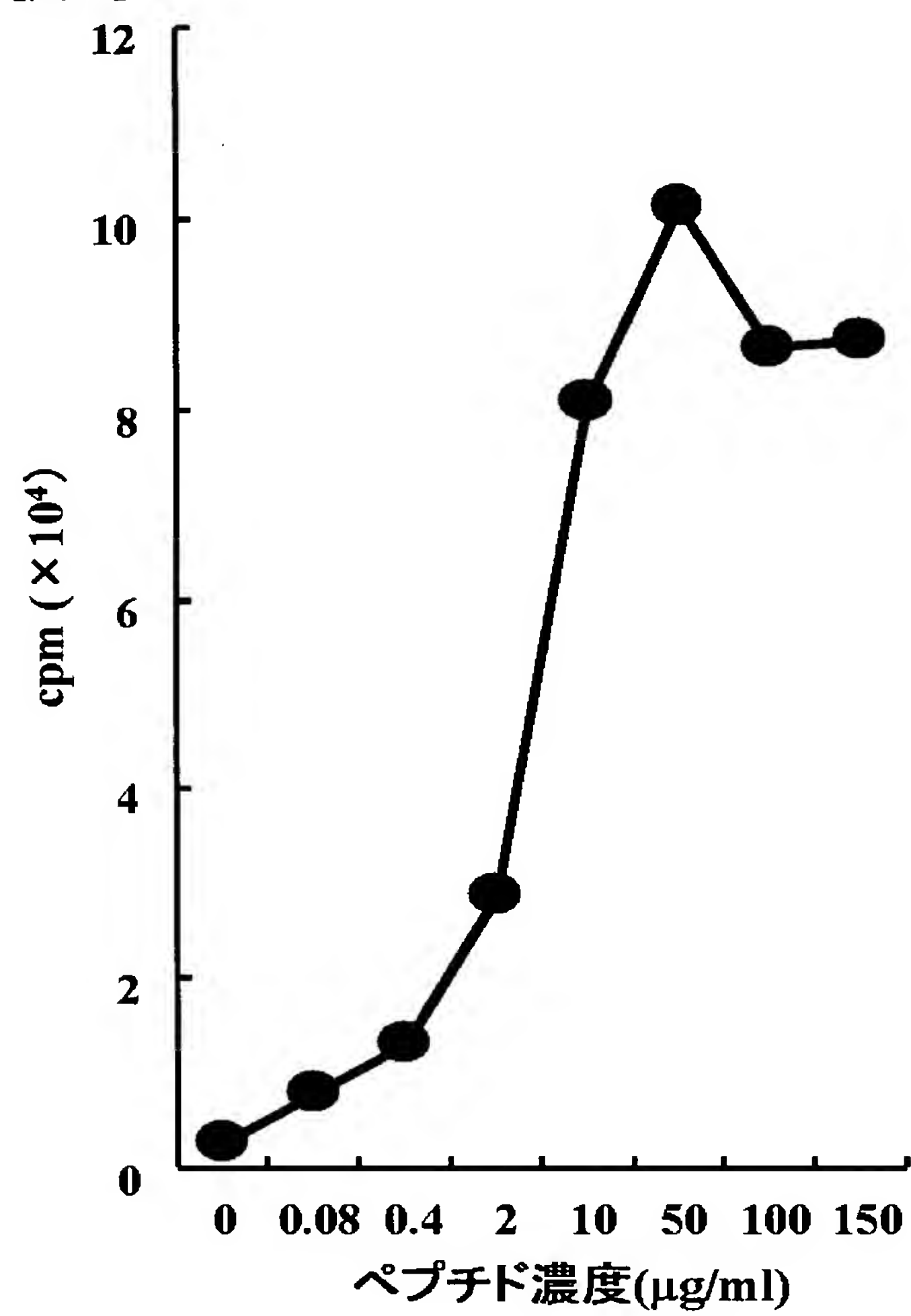
[図15]



[図16]



[図17]



[図18]

